



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“PATOGENICIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* A
FUNGICIDAS DE *Botrytis cinerea* Pers. CAUSANTE DEL MOHO GRIS
EN EL CULTIVO DE *Fragaria vesca* L cv. Albion.”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA TITULACIÓN DE GRADO

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

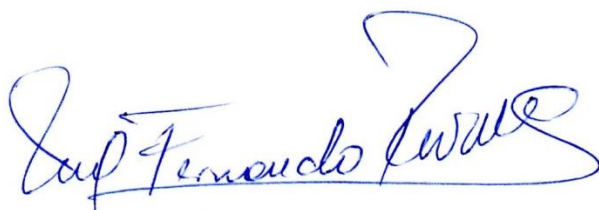
PANIMBOZA YANZAPANTA JUAN GABRIEL

RIOBAMBA – ECUADOR

2017

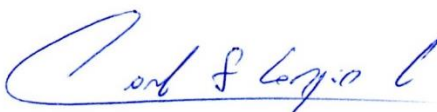
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES****ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

El suscrito **TRIBUNAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN, CERTIFICA QUE:** el trabajo de investigación titulado: **“PATOGENICIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A FUNGICIDAS DE *Botrytis cinerea* Pers. CAUSANTE DEL MOHO GRIS EN EL CULTIVO DE *Fragaria vesca* L”,** de responsabilidad del Sr. Egresado Juan Gabriel Panimboza Yanzapanta, ha culminado y fue prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación y defensa.



ING. JOSÉ FERNANDO RIVAS FIGUEROA

DIRECTOR



ING. CARLOS FRANCISCO CARPIO COBA

ASESOR

RIOBAMBA – ECUADOR

2017

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Juan Gabriel Panimboza Yanzapanta, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes y el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 05 de Julio de 2017



Juan Gabriel Panimboza Yanzapanta

Cédula de Ciudadanía: 1804291811

DEDICATORIA

A mi familia entera, en especial a mis padres **SEGUNDO JOSE PANIMBOZA TISALEMA** y **OLGA INES YANZAPANTA GARCES**; quienes fueron, son y serán el motor de vida para alcanzar muchos objetivos.

A mis hermanos **DARIO HERNAN Y ALEXANDRA PANIMBOZA YANZAPANTA**, quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional y me han motivado.

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi fortaleza espiritual en la ejecución y culminación de la investigación.

Al Dr. Fernando Rivas por su valioso apoyo en la orientación de la investigación en su calidad de Tutor. Al Ing. Carlos Carpio por su apoyo brindado en las actividades investigativas en su calidad de Asesor.

A la virgen **Santa Lucia** por llenar de luz mi vida y permitirme superar retos y desafíos en los siempre sentí su presencia y amor.

A mis padres y hermanos, por todo su cariño, apoyo y comprensión.

A toda mi familia, especialmente a mis tíos Manuel y Lisandro que me brindaron su apoyo siempre.

A los Dr.C. Michel Leiva Mora y al Ing. Álvaro Rivera por su generoso apoyo brindado en esta investigación.

A los Catedráticos de la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, FACULTAD DE RECURSOS NATURALES, ESCUELA DE INGENIERIA AGRONOMICA, por brindarme las bases y herramientas para ser una persona de bien y así tener la oportunidad de ayudar a los demás.

A todos los amigos y amigas con quienes hemos compartido alegrías y tristezas a todos
MI GRATITUD.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xv

CAPÍTULO

I	TÍTULO	1
II	INTRODUCCIÓN	1
III	REVISIÓN DE LITERATURA.	4
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	45
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
VI.	CONCLUSIONES	98
VII	RECOMENDACIONES	99
VIII	RESUMEN	100
IX	SUMMARY	101
X	BIBLIOGRAFIA	102
IX.	ANEXOS	111

LISTA DE TABLAS

N°	DESCRIPCIÓN	PÁG
1.	Ciclo fenológico de la frutilla	8
2.	Recomendación general de fertilización para la fresa (para una densidad de 50.000 plantas por hectárea)	12
3.	Características del campo experimental	37

LISTA DE CUADROS

N°	DESCRIPCIÓN	PÁG
1.	Origen y procedencia de aislados monospóricos de <i>B. cinerea</i> colectados de fincas de frutilla donde se utilizaban fungicidas químicos	53
2.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 24 h posteriores a la inoculación artificial.	60
3.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 48 h posteriores a la inoculación artificial	61
4.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 72 h posteriores a la inoculación artificial.	62
5.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 96 h posteriores a la inoculación artificial.	63
6.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 120 h posteriores a la inoculación artificial	64
7.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 144 h posteriores a la inoculación artificial	65
8.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 168 h posteriores a la inoculación artificial.	66
9.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 192 h posteriores a la inoculación artificial	67
10.	Evaluación de patogenicidad de aislados de <i>B. cinerea</i> en frutos de <i>F. vesca</i> cv. Albeon 216 h posteriores a la inoculación artificial.	68

11. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 24 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción. 70
12. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 48 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción 71
13. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 72 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción. 72
14. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 96 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción. 73
15. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 120 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción. 74
16. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 144 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción. 75
17. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 168 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción. 76
18. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 192 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción 77

19.	Escala diagramática cuantitativa para la evaluación de la magnitud de los daños causados por <i>B. cinerea</i> basada en la sintomatología observada en los ensayos de inoculación artificial	78
20.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del Iprodione a diferentes concentraciones	80
21.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del Pyrimetanil a diferentes concentraciones	82
22.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del Procimidone a diferentes concentraciones	84
23.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del Boscalid a diferentes concentraciones	86
24.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del iodocitrato de cobre a diferentes concentraciones	88
25.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del Carbendazim a diferentes concentraciones	89
26.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del fluodoxinil + cyprodinil a diferentes concentraciones	91
27.	Inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> en un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> del Tiofanato Metílico a diferentes concentraciones	93
28.	Uso de estadísticos de contraste Chi-cuadrado (no paramétrico) para comparar el efecto inhibitor del crecimiento micelial de diferentes	

	ingredientes activos fungicidas sobre <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc 4)	94
29.	Comparación del efecto de inhibición del crecimiento micelial <i>B. cinerea</i> de diferentes ingredientes activos fungicidas mediante un ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i>	96

LISTA DE FIGURAS

N°	DESCRIPCIÓN	PÁG
1.	Ciclo de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	26
2.	Ubicación geográfica de los ensayos experimentales	50
3.	Medio papa dextrosa agar con diferentes volúmenes	52
4.	Características morfológicas de los aislados de <i>B. cinéreas</i> . a) hifas septadas, hialinas, ramificadas de manera irregular o dicotómica, b) conidióforos, c) conidióforos, d) conidios e) microesclerocios y f) macroesclerocios.	55
5.	Crecimiento de colonia de <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc-1) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.	55
6.	Crecimiento de colonia de <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc-2) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia	56
7.	Crecimiento de colonia de <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc-3) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia	56
8.	Crecimiento de colonia de <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc-4) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia	57
9.	Crecimiento de colonia de <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc-5) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.	57
10.	Crecimiento de colonia de <i>B. cinerea</i> (cepa CC-ESPOCH-Bc-6) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.	57

11. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-7) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia. 58
12. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-8) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia. 58
13. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-9) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia 58
14. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Iprodione a las 24 horas concentración 1x. 81
15. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Pyrimetanil a las 24 horas concentración 1x. 83
16. *B. cinerea* causando halos de difusión y aclaramiento del medio de cultivo envenenado con Pyrimetanil a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) 83
17. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Procimidone. 85
18. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Boscalid 86
19. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del iodocitrato de cobre 88

20. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Carbendazim 90
21. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del fluodoxinil + cyprodinil 91
22. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Tiofanato Metílico. 93

LISTA DE ANEXOS

N°	DESCRIPCIÓN	PÁG
1.	Frutos utilizados en la prueba de patogenicidad procedentes del cantón Cevallos Tungurahua	111
2.	Inoculación de Botrytis cinerea en suspensión en frutos sanos de frutilla	111
3.	Micelio gris de Botrytis cinerea sobre el fruto sano	112
4.	Conidióforo de Botrytis cinerea	112
5.	Conidióforo de Botrytis cinerea 400 x	113
6.	Microesclerocios de Botrytis cinerea	113
7.	Microesclerocios de Botrytis cinerea	114
8.	Medio PDA con distintos volúmenes	114
9.	Preparación de soluciones madre con diferentes ingredientes activos	115
10.	Pesaje de funguicida con presentación en polvo mojable	115
11.	Preparación de soluciones madre con diferentes ingredientes activos	116
12.	Medición del crecimiento radial de Botrytis cinerea en medio envenenado con 8 moléculas botrycidas	116
13.	Crecimiento de Botrytis cinerea en medio envenenado con fluodixionil mas ciprodinil	117
14.	Espora geminada de Botrytis cinerea en agar	117

15.	Productos utilizados en la prueba de sensibilidad	118
16.	Sitio del muestreo	118
17.	Características técnicas de los ingredientes activos en diferentes concentraciones utilizadas en la prueba de sensibilidad	119

I. PATOGENICIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A FUNGICIDAS DE *Botrytis cinerea* Pers. CAUSANTE DEL MOHO GRIS EN EL CULTIVO DE *Fragaria vesca* L

II. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de frutilla en el año 2015 fue de aproximadamente 739 622,443 T (Abdelfattah, Wisniewski, Nicosia, Cacciola & Schena, 2006). Ecuador en el año 2007 produjo 30 000 de frutilla mensuales. Estados Unidos, seguido de España, de las que el 96 % corresponden a la producción de frutilla andaluza, y de ello, el 97 % procede de Huelva, siendo sus ingresos cercanos a los 300 millones de euros. Además de estos países existen otros productores que son China, Irlanda, Marruecos, Italia, Israel, de ahí la importancia económica que este cultivo está presentando (Rubinstein, 2015).

Según EL AGRO (2013) este cultivo está concentrado en su mayor extensión en la provincia de Pichincha, también en constante crecimiento en las provincias de Tungurahua, Imbabura, Chimborazo y en pequeñas extensiones en Cotopaxi y zona del Austro, siendo uno de las alternativas importantes de la economía en dichas provincias.

La superficie plantada con frutilla pasó de 125 ha en el año 2003 a 250 ha al 2007. Desde ese período de tiempo ha continuado la tendencia de crecimiento anual entre el 20 y el 30 % de los agricultores dedicados al cultivo de frutilla (Undurraga, P., & Vargas, S. 2013)

Referente al estado sanitario del cultivo la principal enfermedad que causa pérdidas en el cultivo de frutilla es *Botrytis cinerea* Pers, esta enfermedad puede causar daños tanto a nivel de campo como en invernaderos (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N, 2004); para contrarrestar el daño causado por este patógeno el manejo se ha basado principalmente en la utilización de fungicidas los cuales han causado el incremento de resistencia de este patógeno (Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W. H., Kansako, M., Nishimura, k., Takahashi, k., & Oshima, M, 2009; Leroux, Gredt, Leroch & Walker, 2010; Leroux P, 2004; Myresiotis, Karaoglanidis , tzavella-klonari, 2007); por lo que la utilización de químicos sin rotación de moléculas según el mecanismo de acción genera

resistencia volviendo difícil el manejo de la enfermedad, incrementando los costos de las aplicaciones sanitarias sin resultados eficientes, esto disminuye la calidad del cultivo produciendo riesgos incluso para la salud humana.

Dentro de los principales Botricidas utilizados en Ecuador acorde con sus modos de acción podemos mencionar: fenhexamida, fungicidas tipo estrobilurinas QoI, boscalid, anilino pirimidinas y fludioxonil. A nivel mundial se ha informado fungoresistencia en benzimidazoles como el benomyl, metil-tiofanato y carbendazim (Yarden y Katan, 1993; Yourman y Jeffers, 1999), dicarboximidas como el iprodione y vinclozolin (Northover y Matteoni, 1986; Yourman y Jeffers, 1999), fungicidas estrobilurinas tipo QoI (Bardas, Veloukas, Koutita & Karaoglanidis, 2010) ; (Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W. H., Kansako, M., Nishimura, k., Takahashi, k., & Oshima, M, 2009), anilino pirimidinas como el cyprodinil y pyrimethanil (Chapeland, Fritz, Lanen, Gredt, & Leroux, 1999; Myresiotis, Karaoglanidis , tzavella-klonari, 2007); carboxamidas/SDHIs como el boscalid (Leroux, Gredt, Leroux & Walker, 2010) y hidroxianilida como fenhexamidas (Fillinger, Leroux, Auclair, Barreau, Al hajj, & Debieu, 2008; Ziogas, Markoglou & Malandrakis, 2003).

A. JUSTIFICACIÓN

La sierra central ecuatoriana en particular la provincia de Tungurahua los cultivos de frutilla se han visto severamente afectados por la incidencia de *B. cinerea* y por la pérdida de la efectividad en el control de algunos fungicidas químicos, por lo cual se hace necesario introducir nuevas moléculas y comprobar su eficiencia tanto a nivel de laboratorio como a nivel de campo. Es por ello que la introducción de nuevos productos con actividad fungicida pudiera resultar una alternativa promisorio para lograr un manejo más eficiente de *B. cinerea* en el cultivo de frutilla.

En base a esta problemática el presente trabajo propone como **Hipótesis:** Si se dispone de ensayos *in vitro* que caractericen la patogenicidad y susceptibilidad de *B. cinerea* frente a fungicidas comerciales, se podrían desarrollar alternativas de control más eficientes del moho gris en el cultivo de frutilla.

B. OBJETIVOS

1. General.

Evaluar la patogenicidad y la susceptibilidad *in vitro* de fungicidas de *B. cinerea* para seleccionar productos con mayor efectividad en el control químico del moho gris en frutilla.

2. Específicos.

- a. Evaluar la patogenicidad de aislados monospóricos de *B. cinerea* obtenidos a partir de plantaciones comerciales de frutilla donde se utilicen fungicidas.
- b. Evaluar la susceptibilidad *in vitro* de los principales fungicidas usados en el control químico de *B. cinerea*.
- c. Seleccionar los fungicidas que tengan mayor efecto inhibidor del crecimiento micelial sobre *B. cinerea*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE FRESA.

1. Origen

El centro de origen más probable, es Europa y América Septentrional. En Asia se reporta la mayor parte de las especies de *Fragaria* debido a esto se lo considera como el centro de la diversidad del género (Staudt, 1989).

2. Clasificación botánica

La clasificación del cultivo de frutilla es:

REINO: Plantae

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Rosales

FAMILIA: Rosaceae

GENERO: *Fragaria*

NOMBRE CIENTIFICO: *Fragaria vesca*.

NOMBRE COMUN: FRESA (Staudt, 1989)

3. Características morfológicas de la frutilla

a. Raíces

Las raíces tienen aspecto fibroso, que se originan en la corona, se pueden diferenciar raíces primarias que son más gruesas y hacen el papel de soporte, y secundarias que son raicillas más delgadas y de color marfil que son las encargadas de la absorción de los nutrientes y el

almacenamiento de materiales o sustancias de reserva. Las raíces penetran en el suelo hasta 0,80 m. y el promedio de ellas se encuentra en los primeros 0,40 (Casaca, 2005).

b. Tallo

La frutilla es una planta perenne considerada como herbácea, presenta un tallo de tamaño reducido denominado corona, lleva las yemas tanto vegetativas como florales y de ella nacen: las hojas, estolones o guías y las inflorescencias. (Casaca, 2005).

c. Hojas

Las hojas son pinadas o palmeadas, subdivididas en tres folíolos, estas se encuentran insertas en pecíolos de longitud variable, pero es común que en algunas variedades existan 4 ó 5 característica que parece derivarse de la *Fragaria chiloense*, además de un color verde un poco más intenso. Tienen muchas estomas, esto las hace muy susceptibles a la falta de humedad (Casaca, 2005).

d. Estolones o guías

Son brotes delgados, largos y rastreros que se forma a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la base de la corona, los cuales se desarrollan en gran cantidad en épocas de alta temperatura. Por lo general el primer nudo es latente, aunque algunas veces puede dar origen a otro estolón más pequeño. En el extremo del estolón se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo emite raíces, lo que origina una nueva planta con idénticos caracteres que la planta madre (Casaca, 2005).

e. Inflorescencia

Las flores están agrupadas en inflorescencias, de tallos no modificados, en las que una bráctea sustituye en cada nudo a una hoja, mientras que la yema axilar de ésta se desarrolla en una rama secundaria o eje de la inflorescencia. Las inflorescencias son del tipo "cima bífida" que pueden tener un raquis con ramificación alta o ramificación basal, para el primer caso dan una mayor facilidad para la recolección y en el segundo dan a veces frutos más grandes (Casaca, 2005).

f. Flores

La flor de la frutilla es de simetría actimorfa (radial) pedunculada con un receptáculo grueso que se hipertrofia después de la fecundación para convertirse en la parte carnosa y comestible de la planta (Casaca, 2005).

Las flores pueden ser perfectas (hermafroditas), con órganos masculinos y femeninos (estambres y pistilos), o imperfectas con un solo órgano masculino o femenino (unisexuales). Las flores son de color blanco – rosado, van en inflorescencias largas y son polinizadas por insectos, en especial por abejas y por el viento (Casaca, 2005).

Las flores insertas en el eje central de la inflorescencia se abren primero y dan frutos más grandes, las insertas en los ejes secundarios y terciarios y así sucesivamente tiene un número menor de pistilos y dan frutos de menores dimensiones (Casaca, 2005).

g. Fruto

Es un fruto múltiple, el mismo que constituye la parte comestible. El receptáculo maduro tiene hasta 5 cm. de diámetro de formas achatadas, globosa, cónica alargada, cónica alargada con cuello, en cuña alargada y en cuña corta. Su color puede ser rosado, carmín, rojo o púrpura. El verdadero fruto llamado "aquenio" corresponde a las pepitas que van insertas en un receptáculo carnoso. Si la polinización no es completa y quedan pistilos sin polinizar, el fruto resultará deformado. Por esta razón es recomendable el uso de colmenas en un frutillar (Casaca, 2005).

El receptáculo ofrece una gran variedad de gustos, aromas y consistencia que caracterizan a cada variedad. Los aquenios, llamados vulgarmente semillas, son frutos secos indehiscentes, insembrados de aproximadamente 1 mm de largo que se encuentran insertados en la superficie del receptáculo o en pequeñas depresiones más o menos profundas denominadas criptas, el color de los aquenios puede ser amarillo, rojo, verde o marrón (Casaca, 2005).

4. Características fisiológicas de la fresa

De acuerdo a AGROES (2014), la fisiología de la planta de frutilla en el primer ciclo vegetativo se concentra en la acumulación de reservas en raíces, corona y hojas viejas. La misma servirá para la posterior formación de flores y frutos. En general desde un punto de vista productivo, resulta positivo disponer del mayor número de plantas con la mayor cantidad de coronas posibles.

La etapa vegetativa y la fase productiva están determinadas por acción del fotoperiodo y de la temperatura (AGROES, 2014).

La floración es el resultado de un complejo equilibrio hormonal en el que influyen un gran número de factores siendo estos: frío, fotoperiodo, irrigación, disponibilidad de nutrientes, vigor de la planta entre otros (AGROES, 2014).

La formación de estolones se incrementa en condiciones de fotoperiodos largos y altas temperaturas. Además, la formación de estos estolones se puede controlar mediante la aplicación de diversas sustancias como el ácido giberelico. (AGROES, 2014).

5. Variedades

Según EL AGRO (2013), menciona que las variedades como: Oso grande, diamante, monterrey y Albión son las variedades de frutillas que más se cultivan en el Ecuador. Su textura y peso son similares, diferenciándose por su tamaño. En Ecuador se cultivan en zonas que tienen entre 1300 y 3600 m.s.n.m. y con temperaturas que se aproximan a los 15 °C.

a. Oso Grande

Variedad californiana, de color rojo anaranjado; la densidad de plantación es de 6-7 plantas/m², colocadas en caballones cubiertos de plástico, con riego localizado y líneas pareadas. El inconveniente es la tendencia del fruto al rajado, sin embargo, resiste al transporte y es apta para el mercado en fresco (EL AGRO, 2013).

b. Diamante

Se caracteriza por la calidad de fruto, su excelente sabor y tamaño de fruto (entre 30-31 gramos/fruto). La forma de la planta es más compacta, esta produce menos cantidad de fruta. El color interno del fruto es más claro que otras variedades de día neutro, por lo tanto, no es apta para el procesado como lo es para el mercado fresco (AGROES, 2014).

c. Albión

Esta variedad tiene un excelente sabor, calidad, puede mantenerse en postcosecha y presenta mayor preferencia por comercializadores y consumidores. La fruta es grande, cónica y alargada con color rojo intenso. Esta planta permite una recolección de fruta más sencilla (AGROES, 2014).

6. Ciclo fenológico de la frutilla

Según Meier (2001), la fenología de la planta de frutilla es la siguiente:

Tabla 1. Ciclo fenológico de la frutilla

Código	Descripción
Estado principal 0. Brotación	
00	Letrado: las hojas postradas y muertas parcialmente
03	La yema principal comienza a crecer
Estadio principal 1. Desarrollo de las hojas	
11	Primera hoja desplegada
12	2 hojas desplegadas

13	3 hojas desplegadas
N	Los estadios continúan hasta...19
19	9 o más hojas desplegadas
Estadio principal 4. Desarrollo de las partes vegetativas cosechables	
41	Comienzo de la formación de estolones, visibles (alrededor de 2 cm de longitud)
42	Primer hijo de la planta visible
43	Comienzo del desarrollo radicular en el primer hijo de la planta
45	Primer hijo de la planta, con raíces (madura para ser trasplantadas)
49	Varios hijos de la planta, con raíces (maduras para ser trasplantada; formación de plantas hijas en forma continua
Estadio principal 5. Aparición del órgano floral	
55	Los primeros primordios aparecen en la base de la roseta foliar
56	Inflorescencia alargándose
57	Primeras yemas florales salidas (cerradas todavía)
58	Estadio precoz de globo: primeras flores con pétalos formando una bola hueca
59	Estadio de globo: la mayoría de las flores, con pétalos formando una boca hueca
Estadio principal 6. Floración	
60	Primeras flores, abiertas (primeras o flores A, ver esquema)
61	Comienzo de la floración: Alrededor de 10% de las flores, abiertas
65	Plena floración: flores secundarias (tipo B) y terciarias (tipo C), abiertas; caen los primeros pétalos
67	Flores marchitándose: la mayoría de pétalos caídos
Estadio principal 7. Formación del fruto	
71	Receptáculo sobresaliendo de la corona de sépalos
73	Semillas, claramente visibles en el tejido del receptáculo
Estadio principal 8. Maduración del fruto	
81	Comienzo de la maduración: la mayoría de los frutos, blancos
85	Los primeros frutos comienzan a adquirir el color varietal típico

87	Cosecha principal: la mayoría de los frutos, coloreados
89	Segunda cosecha: más frutos coloreados
Estadio principal 9. Senescencia y comienzo del reposo vegetativo	
91	Comienzo de la formación de los botones axilares
92	Hojas nuevas con limbo más pequeño y pedúnculo corto, visibles
93	Hojas viejas, muriéndose: hojas jóvenes, curvándose; hojas viejas, de color varietal típico
97	Hojas viejas, muertas

B. MANEJO DEL CULTIVO

1. Preparación del terreno

La preparación del suelo para el establecimiento de cultivo de frutilla en el Ecuador, comienza con la eliminación de la maleza, remoción de tierra, pase de rastra, y nivelada del terreno (Maroto, 1992).

2. Preparación de camas o camellones

Casaca (2005) enuncia que la formación de camellones se la debe realizar después de abonar y colocar tamo de arroz en el suelo, esto contribuye en la mejora de la estructura del suelo. La altura de la cama debe tener 40 cm por 40 cm de ancho y de largo se recomienda 20 m, el camellón debe tener la forma rectangular, para facilitar la constitución el suelo debe estar en capacidad de campo para favorecer la construcción de la cama. Sin embargo, Obregón y Santos (2014), indica que las camas deben ser construidas en forma de trapecio con una base menor de 61 cm de ancho y una base mayor de 68,6 cm de ancho, esto para evita que las camas se desmoronen. La altura de las camas normalmente es 25,4 cm, lo que permitirá un buen desarrollo radicular y más facilidad para la cosecha manual. La distancia

entre camas debe ser de 1,2 m, lo que permite un mejor tránsito en el área y facilita realizar adecuadamente las labores de manejo.

3. Trasplante y Densidad de siembra

El trasplante de las plántulas de frutilla se efectúa de diferentes formas según las condiciones del medio y el tipo de suelo, considerando que el material vegetativo debe estar libre plagas y enfermedades, la distancia regular es de 25 cm entre planta y 20 cm entre fila o hilera, con estas medidas se obtiene 2 filas o hileras por cada camellón. En el caso de que la instalación sea bajo riego tecnificado la cinta tendrá que ir en medio de la cama y las plantas tendrán un distanciamiento de 0,30 m de la cinta.

4. Fertilización

Chirinos (2013), informa que la fertilización equilibrada en la frutilla es decisiva para obtener alta calidad y rendimiento de fruto. Para establecer un programa adecuado de fertilización para la frutilla, es necesario partir de un análisis de suelo.

Se puede complementar con un análisis foliar que permita dar un seguimiento y ajustes a la fertilización de base. En el Ecuador la fertilización para el cultivo de frutilla empieza con la fertilización con materia orgánica, y en el momento de la formación de los camellones se realiza el llamado abonado de fondo con fertilizantes químicos altos en nutrientes primarios.

Tabla 2. Recomendación general de fertilización para la fresa (para una densidad de 50.000 plantas por hectárea)

Época	Nutriente (kg/ha)					Consumo de Fertilizante			
	N	P	K	Mg	B	Fórmula	g/planta	Kg/ha	Sacos/ha
Siembra	100	300	100			10-30-10	20	1000	20
45 días	50					Nitrato de Amonio	3	150	20
Después de cada cosecha	180	50	150	60	20	18-5-25-6-2			

FUENTE: ANGELFIRE (2001)

5. Riegos

Casaca (2005) indica que debido a que las raíces de la frutilla no profundizan mucho, tienen poca capacidad para absorber agua desde las partes más profundas del suelo, por lo que en unos pocos días sin agua la planta puede detener su crecimiento. Las formas más recomendadas para irrigar la frutilla son por aspersión o por goteo. La cantidad y frecuencia del riego dependerá del tipo de suelo, época y el tamaño de la planta. El sistema de riego más utilizado en frutilla es por goteo, esto sirve para optimizar el agua durante el desarrollo del cultivo, los riegos tienen una frecuencia diaria esto va a depender del estado del tiempo en que nos encontremos. (Casaca, 2005).

Los primeros dos meses después del trasplante son los más críticos en este cultivo y será necesario irrigar todos los días desde el primer mes, de esta manera el suelo permanecerá húmedo. Cuando las plantas están más desarrolladas, 2 meses después del transplante, el

intervalo entre riego se puede distanciar, aunque si es el riego es por goteo se debe hacer diariamente. (Casaca, 2005).

6. Plagas

a. Arañuela (*Tetranychus urticae*)

Según Paullier (2003), son ácaros de cuerpo ovalado, miden 0,5 mm de largo y la coloración es variable, destacándose dos manchas oscuras en el dorso.

La arañuela constituye una plaga capaz de causar perjuicios de entidad en el cultivo de frutilla. Los daños son causados al alimentarse y succionar los jugos de las plantas, visualizándose desde la cara superior de las hojas como pequeñas manchas pálidas. Por lo general viven en la cara inferior de las hojas y las colonias de ácaros forman una tela que les sirve de protección, que puede llegar a cubrir el follaje reduciendo el vigor de la planta y afectando la calidad de la fruta (Paullier, 2003).

Las hembras ponen sus huevos en el envés de las hojas, los cuales, son esféricos y de color amarillento al principio, tornándose rojizos al madurar. La duración del ciclo desde huevo a adulto es de dos o tres semanas con condiciones favorables de temperatura (Paullier, 2003). Tienen mayor descendencia según aumenta la temperatura por arriba de 30 °C (Goodwin, Herron, Gough, Wellham, Rophail, & Parker, 1995).

Para el monitoreo de la arañuela se recomienda revisar regularmente el follaje, examinando las hojas con la ayuda de una lupa de mano para detectar los ácaros. Se deben realizar inspecciones una o dos veces por semana dirigiendo las observaciones al envés o lado inferior de las hojas. Hay que tener presente que la plaga se ve favorecida con clima cálido y seco. Entre las medidas alternativas de control, se deben mantener las malezas controladas en el cultivo y en sus alrededores. (Paullier, 2003).

b. Complejo de trips que atacan a la frutilla

1) Trips de la cebolla (*Thrips tabaci*)

Según Rodríguez y Gerding (2012), existen formas aladas (adultos), y ápteras o sin alas (ninfas), sus huevos son ovipuestos insertos en el tejido vegetal, las ninfas son claras, casi blancas. El adulto es claro, aunque puede ser oscuro dependiendo del alimento, su ciclo promedio es de 14,6 días.

Según Rodríguez y Gerding (2012), el daño es la picadura y raspadura de los tejidos, para que el contenido de las células de las hojas aflore y así alimentarse, lo que provocan en las hojas son pequeñas áreas blanquecinas al principio y luego más homogéneas, de color blanco grisáceo, denominado plateado. Las plantas pierden más agua que lo normal por estas heridas y los patógenos pueden penetrar más fácilmente los tejidos de la planta. Cuando el ataque es más severo, las plantas se tornan de color amarillo verdoso, pudiendo llegar a secarse. Si el daño es en los frutos se produce una deshidratación y deformación de los mismos.

2) Trips de California (*Frankliniella occidentalis*)

El adulto, es alado y de color marrón con bandas en el abdomen. Las ninfas ápteras de color claro anaranjado. Las poblaciones invernales son más oscuras. Su fase de pupa lo realizan en el suelo o en las hojas, su ciclo promedio es de 15,2 días (Rodríguez y Gerding, 2012).

El daño es ocasionado por las ninfas y adultos que succionan el contenido de la célula y provocan su vaciado. Si los ataques tienen lugar en la etapa de floración producen aborto y frutos deformados. Cuando los ataques tienen lugar en el fruto formado, las zonas afectadas toman un aspecto plateado, necrosándose posteriormente. Estas manchas provocan la disminución de la calidad de los frutos (Rodríguez y Gerding, 2012).

3) Trips negro de las flores (*Frankliniella australis*)

Según Rodríguez y Gerding (2012) el trips es de color marrón oscuro o negro, de mayor tamaño que el trips de la cebolla y que el trips de California. Se alimenta principalmente de polen. No provoca daño económico en la frutilla.

Según Paullier J. (2003), las hembras insertan individualmente huevos muy pequeños de color blanquecino en el tejido vegetal. Las larvas y los adultos se alimentan picando las flores y también las hojas. Posteriormente descienden al suelo para cumplir las etapas de prepupa y pupa, emergiendo finalmente los adultos. La duración del ciclo desde huevo a adulto es de dos a cuatro semanas, siendo más cortó al aumentar la temperatura.

Paullier J. (2003), indica que la técnica de monitoreo recomendada para trips es la monitoreo periódico de las plantas, dirigida a los racimos florales, y la observación a simple vista de larvas y adultos de la plaga. Se deben realizar inspecciones al menos semanalmente. Hay que tener en cuenta que con clima cálido y seco las poblaciones de trips pueden ser muy altas.

4) Manejo

Entre las medidas de control alternativas, destacan el mantenimiento del cultivo y los alrededores libres de malezas, además del uso de cortinas vivas (caña, maíz, sorgo) o cortina de malla (trama pequeña). Para la ejecución del control químico, se toma en cuenta el umbral empírico de intervención presencia de trips en el 50% de las plantas revisadas. Alcanzado dicho nivel se debe realizar una aplicación de plaguicida tomando en cuenta las normas de seguridad y residualidad de los productos fitosanitarios (Paullier J , 2003). Se puede utilizar Lambdacialotrina o Metiocarb/Metmercapturon (INTA, 2017)

c. Pulgones (*Chaetosiphon fragaefolii*)

Según UCIPM (2014), el pulgón de la frutilla es de color verde claro a amarillento. Tanto los adultos como las ninfas parecen tener rayas transversas sobre el abdomen y están cubiertos con pelos que tienen una protuberancia en el extremo, los cuales se ven fácilmente con una lupa. Estas rayas y pelos no se encuentran en ninguna otra especie de pulgón en la frutilla.

Según UCIPM (2014), las poblaciones pueden seguir aumentando hasta niveles dañinos cuando las temperaturas de la primavera son moderadas y la humedad es alta. Los pulgones casi nunca alcanzan niveles dañinos, pero de vez en cuando causan una pérdida de rendimiento por la producción de mielecilla. Los depósitos de la mielecilla causan el desarrollo de fumagina (moho negro) y hacen que las pieles blancas, mudadas por las ninfas se peguen a la fruta. Esta contaminación causa que no se pueda vender las frutillas como fruta fresca.

Los pulgones transmiten varios virus que pueden causar pérdidas económicas significativas en las fresas si el plantío se queda en el campo durante unos años. Aunque no es un problema grave en los plantíos de producción anual, la transmisión de los virus es una preocupación principal en la producción de las plantas en los viveros. (UCIPM, 2014).

Según UCIPM (2014), aunque el control biológico puede ayudar a mantener las poblaciones de pulgones a niveles bajos, si el clima primaveral es propicio para su desarrollo. También se aplican tratamientos en los viveros de frutilla para prevenir el aumento de los pulgones y la diseminación de los virus. Si las poblaciones parecen aumentar, una aplicación de un jabón insecticida ayudará a reducir la población de pulgones con un daño mínimo a los insectos benéficos.

d) Gusanos cortadores (*Agrotis ipsilon*)

Según Paullier J. (2003), estos gusanos cortadores, pueden causar daños de importancia en el cultivo. Las larvas o lagartas desarrolladas miden 40 a 50 mm de largo. Los adultos son polillas nocturnas.

El cultivo es perjudicado por la alimentación de las larvas, que pueden causar considerable daño en áreas localizadas: dañan o cortan las plantas a nivel del cuello, al ras del suelo (Paullier J, 2003).

De acuerdo a Paullier J. (2003), la polilla hembra deposita cientos de huevos durante su vida. Las larvas requieren de tres a seis semanas entre que emergen y completan su desarrollo. El estado de pupa transcurre bajo la superficie del suelo, desde donde emerge el adulto completándose el ciclo biológico del insecto. En nuestras condiciones estas especies probablemente presentan tres generaciones al año.

Según Paullier J. (2003), para el monitoreo se recomienda revisar las plantas para detectar daños e insectos. Regularmente se deben realizar observaciones en el cultivo, dirigiendo la atención en especial a la base de las plantas y al suelo. Entre las medidas alternativas de control, es conveniente realizar la roturación anticipada del suelo y mantener las malezas controladas. Con relación al control con plaguicidas, realizarlo solamente cuando se detecte la presencia de daños, utilizar plaguicidas respetando el plazo a transcurrir entre tratamiento y recolección de frutos.

e. Gallina ciega (*Phyllophaga spp*)

Según Vázquez y López (2008), es un insecto peligroso, cuyo daño es ocasionado por la larva, alcanza dimensiones hasta de 3 cm, tiene un aspecto rugoso, color blanco cremoso, cabeza grande color café y endurecida, mandíbulas grandes.

El ciclo de vida del insecto inicia cuando las hembras de los escarabajos, depositan huevos a poca profundidad y cerca de las raíces de malezas o del cultivo y en pocos días estos

huevos eclosionan y emergen pequeñas larvas que comienzan a alimentarse de las raíces; cuando las temperaturas tienden a bajar las larvas descienden hasta un metro de profundidad donde elaboran un refugio donde permanecen en reposo hasta el nuevo ciclo de lluvias (Vázquez y López, 2008).

Cuando llega el nuevo ciclo de lluvias, las larvas perciben el cambio de la temperatura y humedad, se dirigen nuevamente hacia las raíces alimentándose de ellas, con mayor voracidad que el ciclo anterior, alcanzando un tamaño de 3 cm. Al bajar la temperatura y humedad, la larva entra en estado de reposo (Vázquez y López, 2008).

Los métodos de control empleados en el manejo de esta plaga, son barbechos profundos, donde se llegan a destruir gran cantidad de pupas y larvas, las cuales quedan expuestas a los depredadores. Otro recurso importante es el sobresaturar el terreno surcado de agua a con una lámina de hasta de 50 cm por un período de 30 días. Con esta práctica elimina casi en su totalidad todas las larvas de segundo y tercer año (Vázquez y López, 2008).

f) Gusano del elote del maíz (*Helicoverpa zea*)

De acuerdo a UCIPM (2014), el adulto del gusano de la mazorca de maíz es una polilla de color café grisáceo con una extensión de las alas de más o menos 1.5 pulgadas. Cada hembra produce entre 500 y 3000 huevos esféricos con hileras de arrugas en los lados. Los huevos, los cuales son puestos individualmente en la parte inferior de las hojas más jóvenes, al principio son de color blanco, pero luego desarrollan un círculo de color café cerca de la parte superior antes de que salga la larva.

Un gusano recién nacido tiene la cabeza negra y filas de tubérculos y cerdas negruzcas a lo largo del cuerpo. Las larvas más grandes tienen una amplia variedad de colores, desde verde, rosa, o café hasta casi negro. El tiempo necesario para completar una generación depende de la temperatura, pero usualmente es de más o menos un mes (UCIPM, 2014).

Este gusano daña las frutillas ya que se incierte en los frutos, los agujeros de entrada hechos por las larvas más pequeñas no son visibles, y se necesita cortar la fruta para detectar su presencia. Las larvas típicamente se alimentan en la cavidad de aire en el corazón de la

fruta. Las frutas maduras con larvas grandes parecen tener muchas semillas y presentan una o más manchas de color café en la superficie, que parece haberse encogido (UCIPM, 2014).

Se debe revisar si hay huevos sanos y parasitados para determinar la necesidad de aplicar un tratamiento. Plante una variedad de maíz dulce que madure muy temprano alrededor de los campos de frutilla para proveer una reducción significativa de la contaminación de frutillas por el gusano (UCIPM, 2014).

7. Enfermedades

a. Corazón rojizo (*Phytophthora fragariae*)

Según France A. (2012), es una enfermedad frecuente, especialmente en los suelos con exceso de humedad, enmalezados y que sufren daños por insectos en las raíces. El patógeno se disemina a través de esporas flageladas, llamadas zoosporas y que tienen capacidad de nadar en el agua. La producción de zoosporas se acelera a medida que se va saturando el suelo, debido al exceso de riego o lluvia, mal drenaje, compactación. El inoculo puede permanecer en plantas enfermas, agua de riego o tierra contaminada, e incluso adherida a implementos agrícolas. Una vez establecido en el suelo, es prácticamente imposible erradicar este patógeno.

La enfermedad solo afecta a las raíces, las que presentan en el centro un color rojizo oscuro y la corteza se desprende con facilidad. El daño puede comprometer gran parte de las raíces, afectando la absorción de agua y nutrientes (France, 2012).

Los síntomas aéreos que se observan son clorosis (color amarillo) de las hojas, marchitez del follaje, necrosis y muerte de las hojas más viejas. A medida que va muriendo la periferia del follaje, se pierde flores y frutos y la planta deja de emitir estolones. Al final la planta se seca por completo (France, 2012).

La enfermedad se transmite de planta a planta a través de las zoosporas o por contacto de raíces, para el primero es necesario que el suelo este saturado o existan inundaciones que permita la inducción de las estructuras reproductoras (esporangios) y posterior emisión y diseminación de zoosporas. A medida que progresa la enfermedad, la población de la planta disminuye y son remplazadas por malezas hasta que la plantación se hace inviable. (France, 2012).

Para el manejo de esta enfermedad se recomienda nunca plantar frutillas en suelos con problemas de drenaje, sectores bajos y susceptibles a inundarse. Si no existe un buen manejo de agua de riego las posibilidades de contraer la enfermedad aumentan. La mejor medida de control es plantar en camellones altos, que nos ayuden en el drenaje de la zona de cuello y aireación de las raíces, evitando encharcamientos y así impidiendo que las zoosporas puedan nadar hasta el cuello de la planta. También es recomendable inocular a las plantas con *Trichoderma* spp al momento de la plantación (France, 2012).

En caso de presentarse la enfermedad, se recomienda eliminar las plantas con síntomas y aplicar fungicidas granulares o líquidos como metalaxyl o phosetyl aluminio. Es importante revisar que no exista daño de insectos en las raíces, ya que las heridas favorecen la entrada del patógeno (France, 2012).

b. Podredumbre de corona y fruto (*Phytophthora cactorum*)

Según Giménez, Psullier & Maeso, (2003), esta enfermedad se desarrolla en suelos pesados, inundados, con presencia de malezas, exceso de riego y daño por insectos. La enfermedad tiene mayor facilidad de transmitirse junto a las plantas que están contaminadas desde vivero o replantes que hace el agricultor de estolones que crecen en sectores con plantas enfermas.

En la corona produce manchas de color café rojizo a chocolate que destruyen el tejido central y vascular. Como consecuencia de la podredumbre de corona se observa un marchitamiento, que comienza en las hojas más jóvenes. En pocos días se marchita toda la

planta y muere. Las infecciones se manifiestan en cualquier zona de la corona. Cuando la podredumbre es en la parte superior de la misma, al arrancar la planta, ésta se quiebra, dejando la mayor parte de la corona y las raíces en el suelo. Cuando ataca al fruto en estado verde, se producen manchas de color marrón oscuro, en todo el fruto. En caso de frutos maduros, se produce un cambio de color hacia el marrón claro, con tonos violáceos o púrpuras en algunas zonas (Giménez, 2003).

Este hongo es un habitante común del suelo. Por lo tanto, permanece en restos de hojas muertas o en el mismo suelo, bajo forma de micelio o esporas de resistencia, que pueden iniciar potencialmente una infección. Puede también permanecer como infección latente en las plántulas y se puede diseminar por medio del material a ser usado para la plantación. Temperaturas medias a altas (17-25 °C) con condiciones de alta humedad (> 80 %), lluvias, neblina y rocíos, favorecen la infección de las plantas y de los frutos y con condiciones de stress hídrico (Giménez, 2003).

c. Rizoctoniosis (*Rhizoctonia solani*)

Según France (2012), la rizoctoniosis es producida por un hongo común en los suelos agrícolas (*Rhizoctonia solani*), la cual afecta numerosas especies hortícolas y cultivos anuales, pudiendo producir pérdidas importantes. En frutilla aparece sola o formando un complejo de hongos radiculares, siendo común encontrarlo junto con *Fusarium* sp. y *Cylindrocarpon* sp., el conjunto de hongos produce mayor daño. Este complejo es una de las principales causas del decaimiento de las plantas de las plantaciones durante el segundo año de cultivo.

Los síntomas aéreos son clorosis, disminución del crecimiento, aborto de las flores, tardanza en la maduración. En la parte radicular se observa necrosis parcial de raíces primarias, las que adquieren una coloración negra y deshidratada. Esta enfermedad se debe prevenir ya que una vez que se presenta resulta muy difícil o casi imposible sanar las plantas (France, 2012).

Los suelos con exceso de humedad y altos contenidos de nitrógeno favorecen su desarrollo por lo tanto se debe evitar el exceso de ambos. Además, se debe evitar realizar plantaciones en suelos con problemas de drenaje; para esto se debe utilizar camellones altos. Las inoculaciones de las raíces y el suelo con *Trichoderma spp* al momento de la plantación, ayudan a prevenir el desarrollo de la enfermedad. En caso de presentar la enfermedad se recomienda eliminar las plantas sintomáticas para evitar su diseminación. (France, 2012).

d. Oídio (*Sphaerotheca macularis*)

Según France (2012), el oídio es una de las enfermedades más comunes, y de fácil reconocimiento en las plantaciones de frutilla. Se puede encontrar en toda el área del cultivo. Este hongo es muy común también en áreas de gran humedad ambiental y baja temperatura. Los órganos más afectados son las hojas, cáliz de las flores y frutos.

El síntoma inicial se caracteriza por la presencia de zonas, blanquecinas que corresponden al micelio y las esporas del hongo, con apariencia de “polvo” y que crece en el envés de la hoja. Bajo condiciones favorables para el patógeno, estas zonas pueden crecer y unirse, cubriendo la superficie total de la hoja. Con infecciones severas los bordes de las hojas se enrollan hacia arriba. Este hongo puede llegar a afectar los frutos, los que no desarrollan con color normal y pierde su calidad comercial (France 2012).

Según González P. (2014), la eliminación del follaje afectado al momento del trasplante, además de la eliminación de frutos afectados, una fertilización nitrogenada balanceada, y una elección de variedades resistentes disminuyen el riesgo de la enfermedad. Si fuese el caso en el que la severidad sea muy alta se utilizará productos químicos como difenoconazole y ciproconazol.

f. Viruela (*Ramularia tulasnei*)

Según France (2012), la viruela es la principal enfermedad foliar de la frutilla, es fácil de reconocer por sus típicas pústulas y aunque está presente en la mayoría de plantaciones no se realiza un manejo especial para controlarla.

Giménez (2003), menciona que se inicia en hojas jóvenes como manchas púrpuras circulares. Al avanzar el ciclo, las manchas se agrandan y el centro de la lesión toma un color gris claro o blanco característico, quedando los bordes de color rojizo.

El mismo tipo de manchas, aunque más alargadas, puede aparecer en las inflorescencias, en pecíolos y en los cálices florales. La lluvia es el principal causante del aumento de incidencia y la susceptibilidad de las variedades, por eso en climas lluviosos y con temperaturas óptimas para el desarrollo de la enfermedad (20 – 25 °C), la enfermedad puede producir numerosas pústulas que terminan necrosando amplios sectores de las hojas, disminuyendo su área foliar y causando daños económicos (France A., 2012).

Según France A. (2012), el control de esta enfermedad parte con la utilización de plantas sanas ya que pueden venir infectadas desde vivero. Las plantaciones deben ser bien ventiladas, favoreciendo la orientación de las hileras en sentido en que predominan los vientos, esto ayuda a secar las hojas después de una lluvia y le dan menos posibilidades a que las conidias del hongo puedan germinar. Durante el cultivo de la frutilla la viruela normalmente es controlada con el manejo que se le da a la pudrición gris, siendo efectivas la poda y eliminación de las hojas enfermas. También, algunos de los fungicidas que se utiliza para el control de *Botrytis*, tales como: clorotalonil, iprodione, azoxystrobin, cyprodinil y fludioxanil controla ambas enfermedades.

C. Pudrición Gris (*Botrytis cinerea*).

De acuerdo a SENASA (2014) *Botrytis cinerea* agente causal de la “podredumbre gris”, infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección. El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tienen en cultivos de importancia tales como vid, tomate, frutilla, ornamentales.

1. Clasificación taxonómica

Según AGRIOS, (1991) y SENASA, (2014) la clasificación de *Botrytis cinerea* es:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Subclase: Leotiomycetidae

Orden: Helotiales

Familia: *Sclerotiniaceae*

Género: *Botrytis*

Familia: *cinerea*

2. Características morfológicas y ciclo de vida

El patógeno *Botrytis spp* produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro.

Botrytis sp. inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del

tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado. Las etapas de invernación también se propagan mediante cualquier cosa que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo. Cuando los días son cortos, la luminosidad escasa y las temperaturas son del orden de 15-20 °C, las plantas pueden sufrir graves daños. *Botrytis cinerea* aprovecha de flores no fecundadas, heridas o muñones de hojas resultantes de las podas, es decir materia orgánica muerta, para poder iniciar la invasión de las partes vivas de la planta (SENASA, 2014).

3. Importancia económica

Produce pérdidas considerables en la cosecha en almacenamiento debido a que el patógeno se desarrolla bien a temperaturas baja (SYNGENTA, 2007).

4. Ciclo de infección

En el ciclo de infección las esporas de *Botrytis cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire. Es un hongo cosmopolita, ubicuo y sumamente polífago, que sobrevive como saprófito en restos vegetales, así como, en forma pasiva, como esclerocios. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Agrios, 2005).

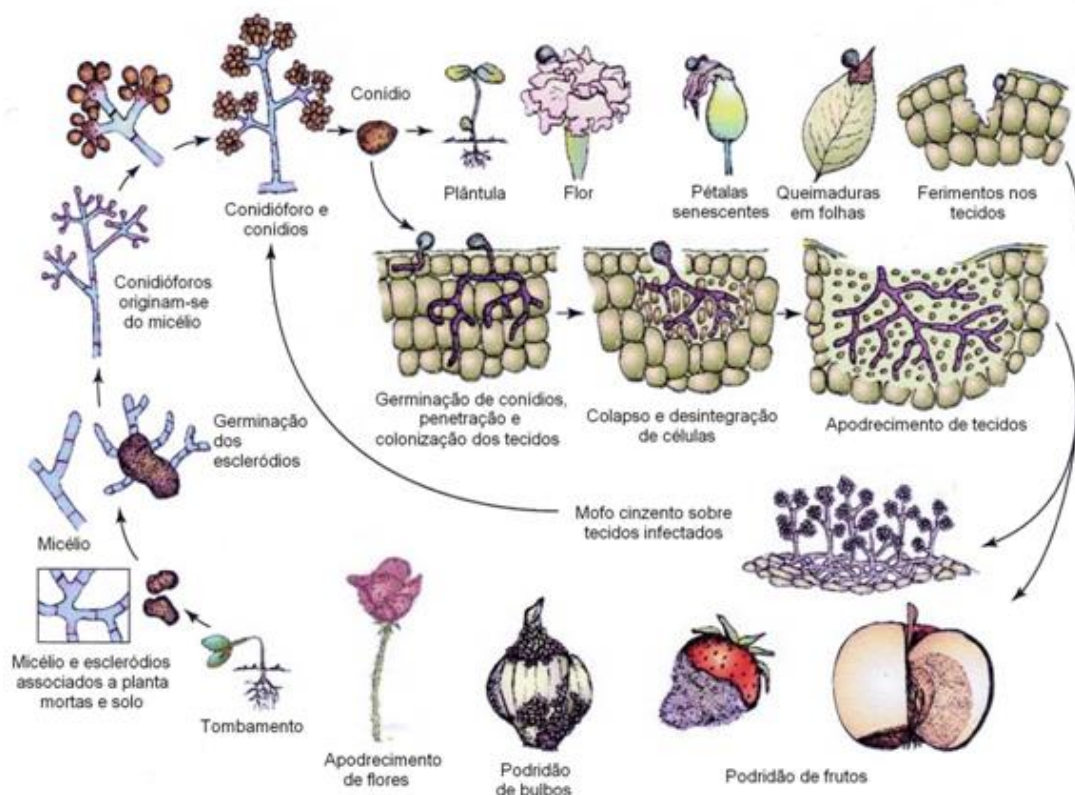


Figura 1. Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*

Fuente: (Agrios, 2005)

En el cultivo de **Frutilla**, afecta a flores y frutos, y principalmente en cosecha y postcosecha. Se manifiesta en flores y frutos con diferentes grados de desarrollo como manchas marrones claras a oscuras. Se caracteriza por producir abundante micelio gris, conidióforos largos y ramificados, y racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o grises, que en su conjunto semejan a un racimo de uvas. Los conidios se liberan en condiciones de alta humedad relativa, tiempo fresco y son diseminados por el viento y salpicaduras; son la principal fuente de inóculo, y el micelio en hojas muertas de frutilla es la principal fuente de producción de conidios (SENASA, 2014)

5. Síntomas

En el cultivo de **Frutilla**, afecta a flores y frutos, y principalmente en cosecha y postcosecha. Se manifiesta en flores y frutos con diferentes grados de desarrollo como manchas marrones claras a oscuras. Se caracteriza por producir abundante micelio gris, conidióforos largos y ramificados, y racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o grises, que en su conjunto semejan a un racimo de uvas. Los conidios se liberan en condiciones de alta humedad relativa, tiempo fresco y son diseminados por el viento y salpicaduras; son la principal fuente de inóculo, y el micelio en hojas muertas de frutilla es la principal fuente de producción de conidios (France, 2012).

Según France (2012), *Botrytis cinerea* es el principal problema sanitario de la frutilla se presenta en cualquier zona de cultivo y el daño se concentra en las flores y frutos, aunque también puede afectar a las hojas.

El principal síntoma se observa en los frutos maduros y corresponden a una pudrición blanda acompañada de una masa de micelio y conidios de color plumizo. El ciclo parte con la geminación de los esclerocios (micelio compactado de color negro) o restos de micelio y conidias que permanecen en residuos infectados de la frutilla. Luego de la germinación se produce varias conidias que son diseminadas por el viento. La inoculación ocurre en los estigmas de las flores abiertas, pétalos o restos de flores senescentes y frutos, si las condiciones son apropiadas (presencia de agua y temperaturas mayores a 15 °C) las conidias germinan y el micelio crece dentro de los tejidos, produciendo una pudrición blanda y una gran cantidad de conidias, que seguirán infectando nuevas flores y frutos. (France, 2012).

4. Manejo

La medida de control incluye evitar altas densidades de plantaciones para lograr una buena ventilación. Las dosis altas en nitrógeno producen tejidos más succulentos lo que facilita el ataque del hongo y posterior colonización, en este caso es necesaria la aplicación de calcio ya que mejoran la resistencia de la fruta al ataque de *B. cinerea*. Una actividad muy

importante es la limpieza del predio, eliminando tejidos viejos, residuos de plantas y frutas ayudan a disminuir el inóculo (SENASA, 2014)

En cuanto al control químico, se debe implementar desde la floración, si las condiciones son propicias para el desarrollo del hongo (follaje mojado y temperaturas mayores a 15 °C). Pero recordando que hay que limitarse a los pocos fungicidas registrados para frutilla.

Entre los productos relativamente nuevos y de acción sistémica, se puede mencionar a azoxytrobin, boscalid, cyprodinil, pyraclostrobin y pyrimethanil, como producto de contacto al fenhexamid, y las mezclas de sistémico y contacto como boscalid + pyraclostrobin y cyprodinil + fludioxanil. Todos ellos tienen una excelente acción sobre Botrytis, pero su utilización depende de la resistencia que presenten. (SENASA, 2014)

Respecto al control biológico, existen productos a base del hongo *Trichoderma* spp. y la bacteria *Bacillus subtilis*, los cuales pueden ser aplicados en horas de la mañana, ya que la radiación mata a estos organismos; en consecuencia, aplicaciones con intensidad lumínica no son recomendables. Otras opciones son la utilización de extractos de cítricos, como el BC-1000, Citrus, Lonlife, Pangermex y Status, los cuales actúan por contacto matando el inóculo e inhibiendo el desarrollo de micelio del hongo, en las dosis recomendadas (SENASA, 2014).

D. RESISTENCIA DE LOS FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE FRUTILLA

1. Fungicida

Según Farrera, P (2004) los **fungicidas** son compuestos químicos u organismos biológicos utilizados para eliminar o inhibir el desarrollo de hongos o sus esporas. Los hongos pueden causar graves daños en la agricultura, lo que resulta en graves pérdidas de rendimiento, calidad y rentabilidad.

2. Importancia de los fungicidas

Margaret T. (2004), menciona que los fungicidas son importantes en el manejo de un cultivo para evitar pérdidas por enfermedades. Las enfermedades son comunes en las plantas, a menudo producen un impacto económico significativo en el rendimiento y calidad, por lo que el manejo de enfermedades es un componente esencial en la producción de la mayoría de los cultivos.

3. Tipos de fungicidas

Según Margaret T. (2004), a los fungicidas se categorizan de varias formas basadas en diferentes características.

a. Movilidad en la planta

De contacto o sistémicos. Los fungicidas de contacto (también llamados protectores) permanecen en la superficie de la planta. Muchos fungicidas de contacto son potencialmente fitotóxicos (tóxicos a la planta) y pueden dañar la planta si se absorben (Margaret T., 2004).

Los fungicidas pueden moverse a través de la planta por ejemplo algunos sistémicos se movilizan a cortas distancias desde el sitio de su aplicación, a través de la lámina foliar de una superficie a la otra denominándose sistémico local o translaminar. Otros fungicidas son sistémicos débiles y se movilizan, desde los sitios de aplicación, un poco más que los sistémicos locales. La mayoría de los fungicidas sistémicos se movilizan más efectivamente debido a su translocación por el tejido xilemático. Cuando son aplicados a la zona radicular, éstos son absorbidos por las raíces y se movilizan hacia arriba por la

corriente transpiratoria de la planta a estos se los conoce como sistémicos de movimiento xilemático. Los sistémicos de movimiento floemático estos presentan una movilidad bidireccional, de lugar donde fueron aplicados en la hoja, hacia otras hojas o hacia las raíces (Margaret T, 2004).

b. Función de protección

La función de protección de los fungicidas puede ser preventiva o curativa. Los fungicidas de contacto son productos adecuados para uso preventivo, ya que funcionan por contacto en la superficie de la planta en donde han sido aplicados. Se requieren repetidas aplicaciones para proteger el nuevo crecimiento de la planta y reemplazar el material que ha sido lavado por la lluvia o la irrigación o degradado por factores ambientales como la luz solar. En el caso de los productos de acción curativa tienen la capacidad de penetrar a los tejidos de la planta, por ejemplo, algunos fungicidas sistémicos presentan tanto una actividad preventiva como curativa (erradicante), de esta manera puede afectar al patógeno después de su infección (Margaret T, 2004).

c. Mecanismo de acción

Los fungicidas que actúan de manera única son activos sólo en un punto de una ruta metabólica en el patógeno o afectan una enzima o proteína esencial para el hongo. Debido a la especificidad en toxicidad de estos fungicidas, estos tienen muy poco efecto en la mayoría de los organismos, pueden ser absorbidos de manera segura por la planta, por lo que tienden a presentar propiedades sistémicas. Como resultado de esta actividad específica, los hongos son más propensos a ser resistentes al fungicida, debido a que una simple mutación en el patógeno usualmente le permite superar el efecto del fungicida,

como por ejemplo previniendo que se enlace al sitio de actividad en el hongo (Margaret T, 2004).

Típicamente los antiguos fungicidas de contacto presentan múltiples sitios de acción, por lo que usualmente afectan a muchos hongos en diferentes clases. A través del desarrollo de investigaciones “in vivo” y debido al incremento en la rigurosidad y número de pruebas regulatorias requeridas para registrar un ingrediente activo nuevo, recientemente los fabricantes de fungicidas han encontrado más fácil desarrollar fungicidas sistémicos de un solo sitio de acción. Como resultado de este enfoque, la resistencia a fungicidas se ha convertido en un tema de gran importancia en el manejo de enfermedades (Margaret T, 2004).

Los fungicidas “matan” a los hongos dañando su membrana celular, inactivando enzimas o proteínas esenciales o interfiriendo con procesos claves tales como la producción de energía o la respiración. Otros impactan rutas metabólicas específicas como son la producción de esteroides o quitina (Margaret T., 2004).

Algunos productos de desarrollo reciente son únicos ya que no afectan directamente al patógeno. Muchos de ellos obtienen una respuesta de la planta huésped conocida como “resistencia sistémica adquirida” (SAR, en inglés). Estos inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR) básicamente imitan señales químicas en las plantas que activan los mecanismos de defensa de la planta como lo son la producción de paredes celulares más gruesas y proteínas anti fungosas. La utilidad de los inductores SAR, sin embargo, ha sido limitada hasta ahora debido a que muchos patógenos son capaces de vencer dichas defensas (Margaret T., 2004).

El conocimiento de cómo un fungicida afecta exactamente a un hongo es útil en el momento de seleccionar un producto. Primero, el modo de acción del fungicida determina cuales hongos serán afectados y por consiguiente cuales enfermedades pueden ser controladas mediante su uso. Segundo, los fungicidas con modos de acción diferentes son necesarios en un programa de manejo de enfermedades para retardar el desarrollo de resistencia a fungicidas (Margaret T, 2004).

c. Grupo químico

Los fungicidas también pueden clasificarse de acuerdo a su composición química. Químicamente, las moléculas orgánicas son aquellas que contienen átomos de carbono en sus estructuras, mientras que las moléculas inorgánicas no los presentan. Muchos de los primeros fungicidas desarrollados fueron compuestos inorgánicos a base de azufre o iones metálicos como el cobre, estaño, cadmio y mercurio que son tóxicos a los hongos. Los cúpricos y los sulfurados aún se utilizan ampliamente. La mayoría de los fungicidas usado en la actualidad son compuestos orgánicos y por consiguiente contienen carbono (Margaret T, 2004).

4. Resistencia a los fungicidas

a. Resistencia

Según la FAO (2012), la resistencia se define como un cambio genético en un organismo como respuesta a la selección por sustancias tóxicas. En el pasado el uso intensivo y continuo del fungicida benomyl permitió el desarrollo de razas resistentes a la familia de los benzimidazoles. Lo cual conlleva a la resistencia cruzada a todos los fungicidas de esa familia (benomyl, carbendazin, metil tiofanato). El reemplazo por las dicarboximidas sistémicas y posterior uso continuo llevó nuevamente a la generación de resistencia a toda esa familia de productos (iprodione, procymidone y vinclozolin). Esto se ha repetido con fungicidas más modernos, por lo consiguiente no se puede depender de un solo fungicida o familia de fungicidas para un programa de control. Captan y dichloflunid han sido fungicidas de contacto que se han utilizado normalmente en mezcla con productos sistémicos, como una forma de evitar el desarrollo de razas resistentes y reforzar la acción química de los productos mencionados. (SENASA, 2014).

b. Resistencia a fungicidas

Según Mondino, P (2001), existen varios tipos resistencia, por lo que es conveniente aclarar los términos a efectos de saber a qué nos estamos refiriendo cuando hablamos de "resistencia".

c. Mecanismos de resistencia

Según FAO (2012), las plagas agrícolas utilizan una gama de mecanismos para sobrevivir la exposición a los tóxicos. La resistencia puede desarrollarse más fácilmente cuando dos o más de estos mecanismos son utilizados al mismo tiempo.

1) Desintoxicación metabólica (enzimática)

La resistencia a través de la desintoxicación metabólica es más frecuentemente encontrada en insectos y es menos común en malezas o patógenos. La misma está basada en sistemas enzimáticos que los insectos han desarrollado para desintoxicar las toxinas. (FAO, 2012).

2) Sensibilidad reducida en el sitio de acción

Con este mecanismo el sitio de fijación del plaguicida se cambia de manera que no pueda efectivamente fijarse al sitio de acción, eliminándose de esta manera o reduciéndose significativamente la efectividad del plaguicida. Este es el mecanismo más común en los hongos y malezas, y también es muy común en los insectos. (FAO, 2012).

3) Penetración reducida

Este mecanismo retarda la penetración del plaguicida a través de la cutícula de los insectos resistentes. Este mecanismo de por sí solo produce bajos niveles de resistencia. Sin embargo, al retardar la penetración del tóxico a través de la cutícula se puede aumentar enormemente el impacto de otros mecanismos de resistencia. (FAO, 2012).

4) Secuestración

En plantas, el plaguicida se mueve de partes sensibles del organismo a un sitio tolerante, tales como una vacuola, donde es efectivamente no dañino al organismo objeto de control. Las enzimas metabólicas aumentan considerablemente (hasta 15% del total del cuerpo de la proteína) y fijado al insecticida, pero el insecticida no se metaboliza, o sea no es secuestrado. (FAO, 2012).

5) Resistencia de comportamiento

Este mecanismo de resistencia ha sido informado para varias clases de insecticidas, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. La resistencia de comportamiento ha sido informada también para el ratón. La resistencia de comportamiento no tiene la misma importancia que los mecanismos de resistencia fisiológicas mencionados anteriormente pero que pueden considerarse como un factor contribuyente que conlleva a evitar las dosis letales de un plaguicida (FAO, 2012).

E. PATOGENICIDAD

La patogenicidad es la capacidad de ciertos organismos para incitar el desarrollo de una enfermedad infecciosa. Cuando existen lesiones de una enfermedad se asocia con varios entes vivos, no siendo todos los agentes causales de la enfermedad. La aplicación de los postulados de Koch permiten llegar a determinar el agente causal de una enfermedad desconocida. (Loor, 2008).

1. Postulados de Koch.

Los postulados de Koch fueron formulados por Robert Koch, a partir de experimentos con *Mycobacterium tuberculosis*, para establecer la etiología de la tuberculosis, actualmente esta metodología se ha sido generalizada para el resto de las enfermedades infecciosas. (Volcy, 2008).

a. Postulados de Koch.

- 1) El patógeno es asociado estrictamente y siempre con enfermedad en todas las plantas enfermas absolutamente sin excepciones (Agrios, 2005).
- 2) El patógeno, como potencial agente causante, debe ser aislado desde las plantas con los síntomas y establecido en cultura pura. Esto puede ser difícil con parásitos obligados, pero las metodologías modernas han ido evolucionando para satisfacer este requisito (Agrios, 2005).
- 3) Las plantas sanas de prueba deben ser de la misma especie y cultivo, y la inoculación de una planta sana debe reproducir exactamente los síntomas iguales. Esto puede ser difícil cuando el organismo es aislado de un cultivo desconocido. El completo rango de síntomas se debe reproducir idénticamente a la planta enferma inicial, tomando en consideración las diferencias entre la planta inicial y la planta de prueba, el ambiente y la salud del inóculo (Agrios, 2005).
- 4) El patógeno debe ser re-aislado de la planta inoculada y la identidad confirmada como iguales a la aislante original. El organismo recuperado debe ser idéntico al aislante original, sin ninguna excepción (Agrios, 2005).

F. USO DE LOS FUNGICIDAS

1. Funguicidas

Un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fungicas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad. No todas las enfermedades causadas por hongos pueden controlarse adecuadamente con fungicidas Las enfermedades causadas por otro tipo de organismos, desórdenes causados por factores abióticos y daños de insectos, no son controlados por fungicidas. (“The American Phytopathological Society”, 2017)

a. Control Químico

Es el uso de sustancias químicas para matar o inhibir al patógeno en algunas etapas de la patogénesis. La mayoría son fungistáticos, bacteriostáticos, o sea, no matan, sino que inhiben el desarrollo del microorganismo (Gepp y Mondino, 2011).

b. Estrategia de uso

Según Gepp y Mondino (2011), las enfermedades cumplen ciclos. Inicialmente el inóculo primario (esporas, micelio, masas de bacterias, huevos o larvas de nematodos) produce las primeras infecciones. Este inóculo debe llegar hasta los tejidos susceptibles de la planta y deben existir las condiciones apropiadas de humedad y temperatura, producir infecciones. Luego sigue un período de incubación dentro de la planta, aparecen los síntomas y por último sobre estos síntomas el hongo esporula. Cada ciclo se puede considerar como si fuera una cadena y la estrategia de control más efectivo consiste en cortarla en su eslabón más débil, o sea cuando el patógeno está más vulnerable.

F. FUNGICIDAS CON ACCION BOTRYCIDA

1. Citrubact

a. Definición.

Es una solución concentrada, con acción fungicida-bactericida para uso en desinfección de material vegetal, medios de enraizamiento. Se utiliza en los tratamientos preventivos y curativos en los cultivos ya establecidos, en postcosecha (AGROBEST, 2010).

Según AGROBEST, (2010) citrubact contiene un complejo de Iodocitrato de Cobre; el ingrediente activo del citrubact, actúa causando la oxidación de la pared celular de los organismos patógenos.

b. Composición química

Tabla 3. Características del campo experimental

COMPOSICION QUIMICA	
Ácido cítrico	20%
Ácido ascórbico	8%
Ácido yohídrico	10%
Cobre	3%
Iodocitrato de Cobre	196g/L

FUENTE: AGROBEST, (2010)

c. Modo de acción

Según AGROBEST, (2010) es un producto sistémico y protectante, de acción de preventiva y curativa. Su modo de acción es múltiple, actúa sobre las estructuras reproductivas de hongos y bacterias, creando de esta manera, una acción preventiva que evita la reinfestación por patógenos transportado desde otros lugares infectados.

d. Ventajas

El citrubact presenta un sin número de ventajas en su aplicación para el control de microorganismos patógenos. Es soluble en agua, lo cual facilita su aplicación por medio de equipos aspersores de todo tipo sin que se presente decantaciones o precipitaciones que puedan obstruir los equipos (AGROBEST, 2010)

e. Toxicidad

. Está formado por un complejo de Iodocitrato de Cobre, estable, no corrosivo, que no mancha y que no se acumula en los suelos tratados con el citrubact, pues es lavado en un 98%. Iodocitrato de Cobre, al llegar al agua no interactúan con las especies animales ni vegetales, conservando así el equilibrio de las aguas en que se encuentra, además no es tóxico y muy seguro cuando los humanos entran en contacto con él (AGROBEST, 2010)

f. Control

Según AGROBEST, (2010) controla un amplio espectro de enfermedades causadas por hongos y bacterias, interrumpe la función de las enzimas y los sistemas de transporte de energía, afectando la integridad de las membranas de células y organelos. No produce fitotoxicidad, actúa tanto en nivel flemático como xilemático.

g. Productos adicionales del citrubact.

Según AGROBEST, (2010) posee en su formulación coadyuvantes agrícolas, que facilita una mejor cobertura del material tratado, mejorando su acción translaminar y de penetración capilar por los haces vasculares de la planta. Los surfactantes presentes en el producto están clasificados como biodegradables.

2. Benomil.

a. Definición.

Es un fungicida curativo, sitio de acción específico, de amplio espectro, que controla una gran cantidad de enfermedades fungosas en cultivos hortícolas, ornamentales, cereales,

frutales, viñas. Se lo puede utilizar en tratamientos de post-cosecha para evitar pudriciones causadas por hongos filamentosos. (www.point.cl 2017)

b. Modo de acción.

Fungicida que actúa inhibiendo la formación de la beta tubulina que es indispensable para la síntesis de los microtúbulos cromosómicos interfiriendo de esta manera con la división nuclear del hongo, bloqueando la mitosis. El producto detiene el desarrollo del tubo germinativo, inhibe la multiplicación celular y el crecimiento del micelio e inhibe la formación del apresorio y finalmente el hongo muere. (www.antalien.net 2017).

Benzimidazol sistémico de absorción radical y foliar, traslocación principalmente acrópeta y actividad fungicida por contacto: preventiva y curativa, presentado en forma de polvo humectable para aplicar en aspersión foliar. (www.terralia.com, 2017)

c. Resistencia.

El uso continuo y exclusivo de benomil, puede inducir a algunos hongos a crear resistencia al producto, en cuyo caso se recomienda implementar un programa de aplicaciones alternando benomil con otros Fungicidas de acción similar (agricense.com, 2017)

3. Methil thiofanato

a. Definición

TOPSIN M-70%WP es un fungicida curativo y preventivo de acción sistémica, con prolongado efecto residual, eficaz para controlar pudriciones de frutos en cultivos como: tomate, fresa, tomate de árbol, maracuyá y también eficaz para control de enfermedades

ocasionadas por hongos de suelo que producen pudriciones de la base del tallo y raíz en diferentes cultivos.

La micronización del producto permite que el ingrediente activo sea más eficaz debido al tamaño de las partículas de 3 μm , esto permite una mejor traslación del producto hacia el sistema vascular.

b. Mecanismo de acción

Se ha demostrado que los fungicidas del grupo de los benzimidazoles se unen a la subunidad β de Tubulina, una proteína esencial para los eucariotas, que interviene en la división nuclear en el hongo (Plimmer, Gammon & Ragsdale, 2003).

4. Pyrimethanil

a. Definición

Según Bayer, (2017) es un fungicida sistémico translaminar de acción protectante y curativa para el control de hongos Deuteromicetes que pertenecen al grupo químico de las anilino pirimidinas.

b. Modo de acción

Inhibe la secreción de enzimas de la botrytis, inhibiendo la asimilación de los nutrientes, el desarrollo del tubo germinativo y, por ende, el crecimiento del hongo; además presenta excelente acción de contacto, actividad translaminar y acción de vapor, lo que permite un mayor cubrimiento a todas las superficies de la planta. (Bayer, 2017)

c. Mecanismo de acción

Actúa inhibiendo la secreción de enzimas requeridas para el proceso de infección, además inhibe la extensión del tubo germinativo y el crecimiento micelial, impidiendo así las posibilidades de infección. (Bayer, 2017)

5. Iprodione**a. Definición**

Es un fungicida selectivo, sistémico y translaminar, de acción preventiva, curativa y antiesporulante muy residual, que impide la colonización, avance y esporulación de enfermedades. (www.nufarm.ec, 2017)

b. Modo de acción

Fungicida penetrante, sistémico local y translaminar, penetra por las hojas y se acumula muy cerca del sitio de penetración. No brinda protección a tejido nuevo producido después de la aplicación (www.nufarm.ec, 2017).

c. Mecanismo de acción

Impide el normal intercambio de señales de la membrana con el ambiente, especialmente de la señal osmótica, por el bloqueo de la MAP histidin kinasa. Afecta el intercambio de señales de la membrana con el medio, afecta el metabolismo de lípidos y la respiración celular, interfiere la biosíntesis de ADN. Produce engrosamiento y daño micelio por

perturbación de membranas. Iprodione posee efecto colateral tipo inhibidor de síntesis de ergosterol (IBE). (www.nufarm.ec, 2017)

6. Boscalid

a. Definición

Según BASF, (2014), es un fungicida el cual pertenece a la familia de las anilidas, su de acción sistémica y translaminar, protectora y curativa le da la característica relevante es el gran espectro de acción.

b. Modo de acción

Actúa inhibiendo la respiración del hongo, al interrumpir a nivel de las mitocondrias la síntesis de la enzima succinato ubiquinona reductasa (también conocida como complejo II), difiere de las estobilurinas y otros fungicidas en su modo y sitios de acción, lo que lo transforma en una herramienta de suma utilidad en programas anti-resistencia. El boscalid posee una interesante actividad sistémica. Una parte del producto aplicado se trasloca de modo translaminar y otra parte vía corriente transpiratoria en dirección acropétala hacia el extremo y bordes de la hoja (www.sag.cl, 2014).

c. Mecanismo de acción

Según BASF, (2017) Boscalid tiene un movimiento sistémico acropetalico con efectos curativos.

7. Procimidona

a. Definición

Según. ASPROAGRO, (2015) fungicida preventivo y curativo, inhibidor del crecimiento micelial y de la germinación conidial, en los hongos Ascomycetos.

b. Modo de acción

Sialex es fungicida preventivo y curativo con acción translaminar que actúa por contacto y barrera cuticular de alta residualidad. Inhibiendo la germinación de las esporas y bloqueando el crecimiento del micelio. Inhibe la germinación de conidias y crecimiento micelial (ASPROAGRO, 2015)

c. Mecanismo de acción

Trabaja en la transducción de señales osmóticas en la membrana celular, mediante la señal de transducción de la Histidine- quinasa, sobre los receptores específicos (os -1, Daf1), produciendo cambios en la morfología de la hifa, y atrofia e hinchazón de la hifa y tubo germinativo (ASPROAGRO, 2015)

8. Fludioxonil + Ciprodinil

a. Mecanismo de Acción

Ciprodinil interrumpe el crecimiento del micelio mediante la inhibición de la cistationina- β -liasa, una etapa esencial en la biosíntesis de la metionina; así se interrumpe el crecimiento del micelio en la planta.

Fludioxonil es un fenilpirrol y actúa haciendo inhibición de una proteína quinasa mitogeno activada (MAP) involucrada en la ruta de transducción de la señal osmo-regulatoria (síntesis del glicerol). Estudios in-vitro del fludioxonil revelaron la inhibición de la germinación conidial, del tubo germinativo y del crecimiento del micelio. (SYNGENTA. 2017)

b. Modo de Acción

Según SYNGENTA (2017), la absorción del fludioxonil en los tejidos de la planta es limitada, es principalmente un fungicida del tipo de contacto. El ciprodinil es un fungicida anilino pirimidino sistémico de amplio espectro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

1. Localización

El presente ensayo se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2. Ubicación geográfica

Altitud: 2820 m.s.n.m

Latitud: 1 ° 38' S

Longitud: 78° 40' W.

3. Condiciones dentro de Laboratorio

Temperatura: 19 °C .

Humedad promedio: 40 -60 %.

B. MATERIALES

1. Material biológico.

- 450 Frutos de *Fragaria vesca* cv. Albion.
- 9 aislados monospóricos de *B. cinerea*.

2) Materiales y equipos de laboratorio

a. Aislamiento

- Formato de registro de Datos
- Cámara Fotográfica
- Agua corriente
- Cuchillos
- Recipientes para lavado de muestras
- Alcohol 70 %
- Agua estéril
- Papel absorbente estéril
- Cámara de aislamiento de flujo laminar
- Mechero de Bunsen
- Medio de cultivo: agar-agar

b. Obtención de cultivo puro

- Medio Nutritivo: Papa Dextrosa Agar y Agar Nutritivo
- Autoclave
- Placas de Petri
- Aguja de aislamiento
- Alcohol
- Mechero de Bunsen
- Marcador permanente
- Incubadora

c. Observaciones microscópicas.

- Microscopio Óptico
- Estereoscopio

- Placas Porta y Cubreobjetos
- Laftofenol-violeta de genciana
- Lente Ocular con escala.
- Cámara Fotográfica.

d. Ingredientes activos

- Boscalid + Cresoxin methyl
- Carbendazim
- Iprodione
- Methil Thiofanato
- Procymidone
- Pyrimethanil
- Iodocitrato de Cobre
- Fluodioxinil + Ciprodinil
- Cyprodinil
- Balanza analítica digital
- Micropipeta de 1000 μ L
- Erlenmeyer 100 mL
- Baño María
- Parafilm
- Tubos falcón de 50 mL

e. Materiales de oficina

- Formatos de registro de datos.
- Computador.
- Marcadores.
- Calculadora.
- Grapadora
- Perforadora.
- Cámara fotográfica

C. METODOLOGÍA

1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

2. Factores en estudio

a. Factor A: Agente causal de la pudrición gris de la frutilla

b. Factor B: Patogenicidad/Agresividad de *B. cinerea*

b. Factor C: Ingredientes activos con actividad funguicida

Previa a la caracterización, se realizó el aislamiento de los hongos asociados mediante cultivos monospóricos, según los criterios de Balmas , Santori & Corazza (2000). Se tomó una pequeña porción de micelio con esporas de las placas de Petri (90 mm Ø) con medio PDA y se suspendió en un tubo de ensayo estéril que contenía 10 mL de agua destilada estéril. Después de una agitación manual, la suspensión conidial se vertió en placas de Petri (90 mm Ø) con Agar Agua 2 %, e inmediatamente se eliminó el exceso de agua de las placas por decantación.

Posteriormente las placas fueron colocadas en posición vertical y se incubaron a 25 °C, en oscuridad durante 24 h. Con un estereoscopio, se localizaron conidios germinados y con una aguja se tomaron individualmente, los cuales fueron transferidos a placas de Petri (90 mm Ø) que contenían 20 mL del medio de cultivo PDA, las cuales fueron incubadas a 20 °C hasta la obtención de colonias puras.

3. Caracterización cultural

Para la caracterización cultural se siguieron los criterios sugeridos por Elad, Williamson, Tudzynski, & Delen (2004). La identificación de los hongos aislados, inicialmente partió de las características culturales en donde se tomó en consideración: el crecimiento micelial (diámetro expresado en mm) de los aislados, presencia de conidióforos, conidios, microesclerios y esclerios. Además, se describió el color del anverso y del reverso de las colonias.

4. Caracterización morfológica

Para la identificación se siguieron los criterios sugeridos por Elad, Williamson, Tudzynski, & Delen (2004). Para la observación de los aislados fúngicos se prepararon láminas portaobjeto, y se utilizó una gota de lactofenol con azul de algodón la cual fue colocada sobre una porción de micelio. Se examinaron al microscopio las estructuras reproductivas de los diferentes aislados.

5. Prueba de patogenicidad

Se obtuvieron muestras de frutos con síntomas de *Botrytis cinerea* procedentes de la provincia de Tungurahua, del cantón Cevallos, parroquia la matriz.

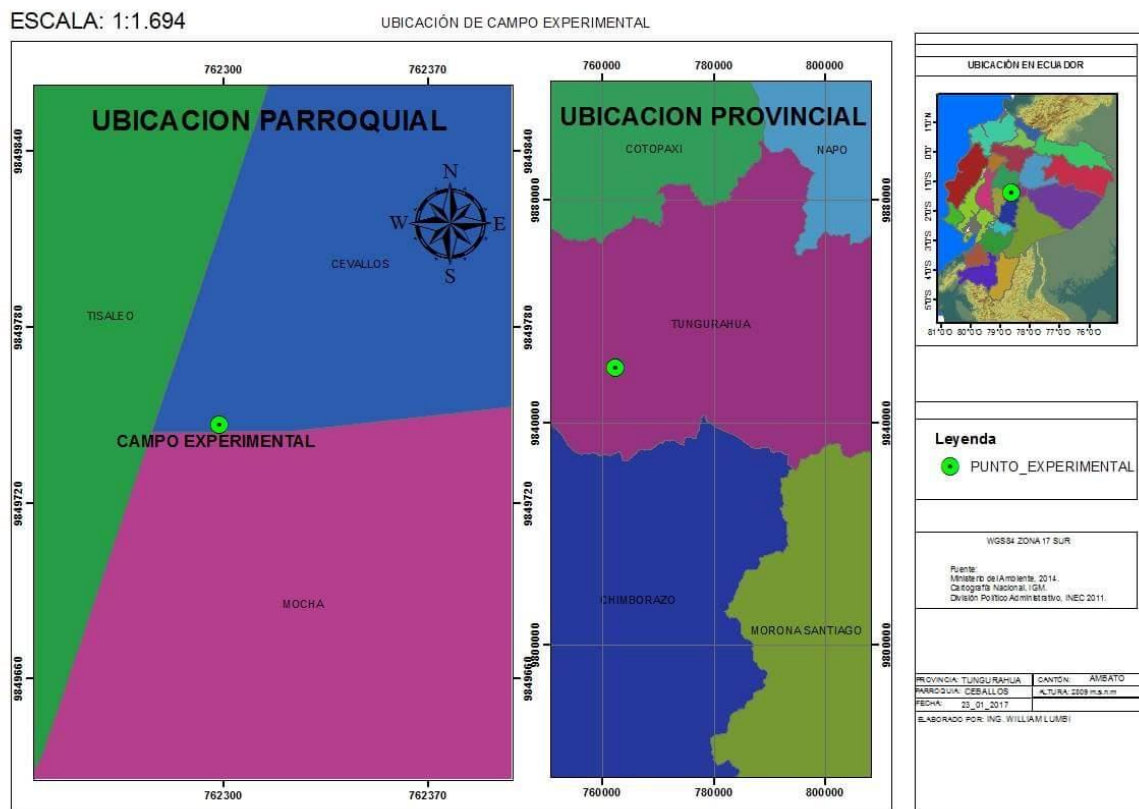


Figura 2. Ubicación geográfica de los ensayos experimentales

Con la finalidad de determinar la agresividad de las cepas, se realizó pruebas de patogenicidad en frutos de fresa de tamaño mediano con un 90 % de madurez fisiológica, inicialmente estos fueron sumergidos a una solución con alcohol al 70 % por 5 minutos y luego lavados con agua destilada estéril por 3 minutos.

La preparación del inóculo consistió en la suspensión de conidios y micelio en agua destilada estéril de cada cepa, las mismas que fueron colocados en tubos Falcón con un volumen de 40 cc con su respectiva codificación.

Los frutos previamente desinfectados fueron inmersos en las suspensiones fúngicas de cada cepa, por 10 segundos, luego estos fueron introducidos en fundas plásticas transparentes pequeñas e incubadas a 20 ° C acompañadas de papel absorbente húmedo. El control absoluto consistió en la inmersión de los frutos en agua destilada estéril.

Para el desarrollo de la evaluación se estableció una escala descriptiva en base a las características cualitativas de la infección de los frutos. Dicha escala se construyó en base a la sintomatología observada. Transcurridos 8 días finalizó la evaluación por cuanto la infección cubrió toda la superficie de los frutos, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el software IBM SPSS STATISTIC 21.0 (George & Mallery, 2016).

6. Prueba de susceptibilidad *in vitro*

Se escogió la cepa que mayor velocidad de crecimiento mostró en el medio de cultivo PDA para el estudio de susceptibilidad se utilizaron los siguientes ingredientes activos: iodocitrato de cobre, carbendazim, methyl thiophanato, pirymethanil, iprodione, boscalid + cresoxin methyl, procymidona y fluodioxinil + ciprodinil.

El establecimiento de las dosis de los productos con acción botrycida tomo como base la dosis de campo y se incluyó dobles decrecientes sobre y bajo esta dosis, en total se definieron las siguientes dosis: 4x, 2x, 1x, 0,5x y 0,25x. Para establecer la prueba de sensibilidad se consideró la preparación de una solución madre de la cual se calculó por principio de volumetría la cantidad necesaria para fijar rangos de concentración diferentes.

Los diferentes volúmenes de solución madre fueron complementados con medio PDA, de esta manera se consiguió preparar 40 mL de medio de cultivo PDA más las moléculas de los funguicidas utilizando el método de dilución en agar. El medio fue dispensado a razón de 20 mL en placas de Petri. Para la inoculación de los aislados *B. cinérea* se tomaron discos de medio PDA con cultivo puro y se colocaron de manera invertida en las placas de Petri con las diferentes moléculas.



Figura 3. Medio papa dextrosa agar con diferentes volúmenes

Las dosis establecidas para la preparación de la solución madre se las preparo en un volumen de 50 mL de agua destilada estéril en tubos falcón, para esto en el caso de los funguicidas en emulsión concentrada se utilizó un micropipeta para tomar el volumen calculado. Se realizaron evaluaciones del crecimiento de los discos de medio PDA con el aislado de *B. cinerea* cada 24 horas, para esto se midió el crecimiento diario en milímetros y se lo comparo con el crecimiento de los discos en medio PDA sin funguicida.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *B. cinerea*

Un total de 9 aislados monospóricos se obtuvieron a partir de frutos de frutilla cv Albeón con síntomas típicos del moho gris, los cuales fueron colectados en la finca de Juan Panimboza perteneciente a la parroquia matriz cantón Cevallos, provincia de Tungurahua (cuadro 1, figura 2).

Cuadro 1. Origen y procedencia de aislados monospóricos de *B. cinerea* colectados de fincas de frutilla donde se utilizaban fungicidas químicos

Aislado	Finca	Parroquia	Cantón	Provincia	Cultivar	Conservación
CC- ESPOCH- Bc-1	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-2	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-3	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-4	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-5	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C

CC- ESPOCH- Bc-6	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-7	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-8	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C
CC- ESPOCH- Bc-9	Juan Panimboza	La Matriz	Cevallos	Tungurahua	Albion	Agar inclinado a 4° C

En todos los aislados se observó a nivel de colonia el desarrollo de un micelio blanco, denso, piloso que posteriormente se tornó gris. Las hifas fueron septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular o dicotómica (figura 4 a). Se observó la presencia de conidióforos septados, macronematosos que nacieron directamente del micelio sin formar una estructura especializada.

El extremo de cada conidióforo finalizó en una estructura similar a una ampolla donde se desarrollaron conidios solitarios, unicelulares, lisos, globosos con dimensiones promedios de 9-11 x 6-7 μm (figura 4 b, c y d). Asimismo, en la mayor parte de los aislados se observaron numerosos microesclerocios negros en microcultivos en el medio de cultivo PDA, así como macroesclerocios en cajas de Petri en cultivo de un mes (figura 4 e y f).

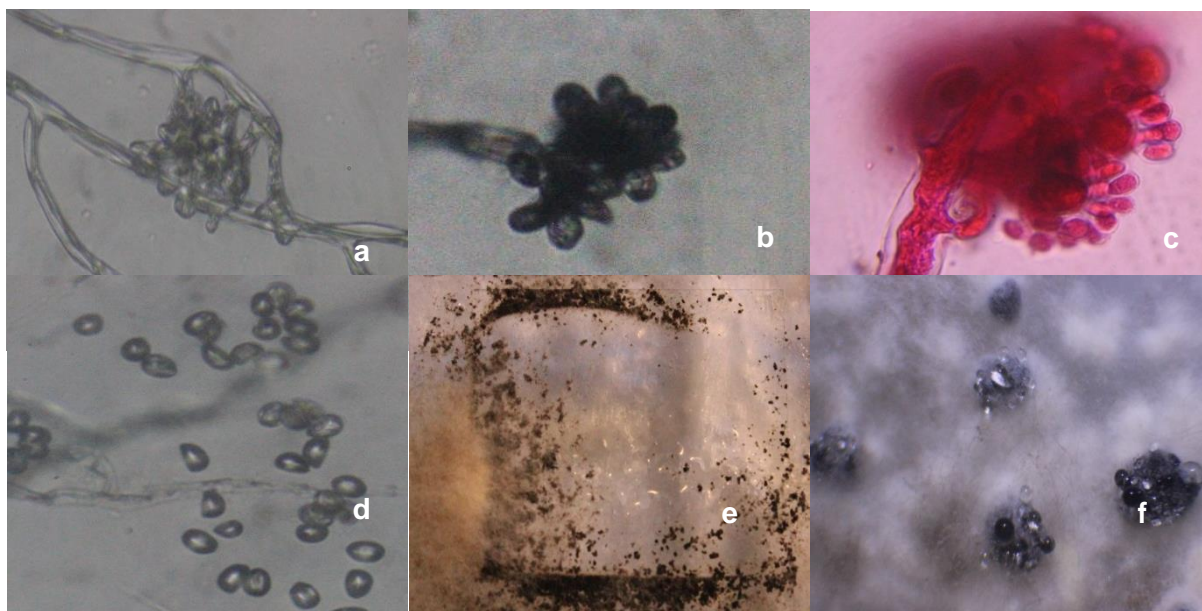


Figura 4. Características morfológicas de los aislados de *B. cinéreas*. a) hifas septadas, hialinas, ramificadas de manera irregular o dicotómica, b) conidióforos, c) conidióforos, d) conidios e) microesclerocios y f) macroesclerocios.

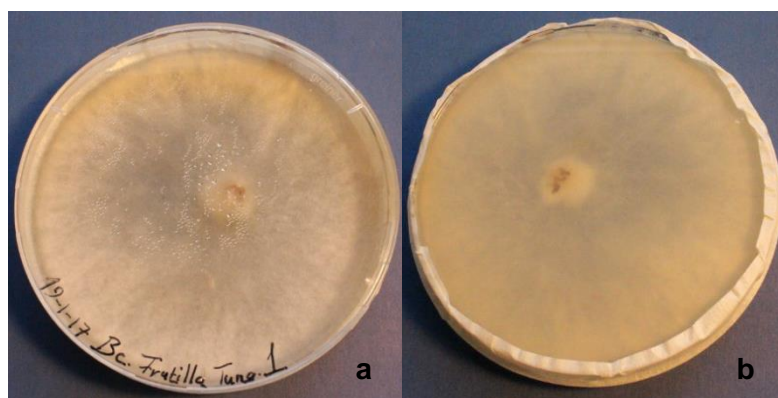


Figura 5. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-1) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.

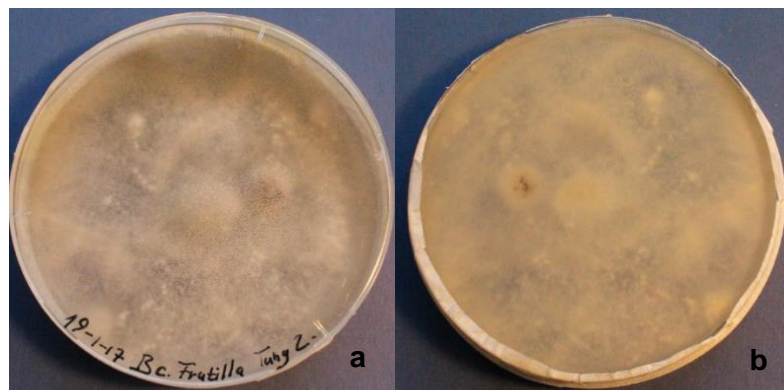


Figura 6. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-2) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia

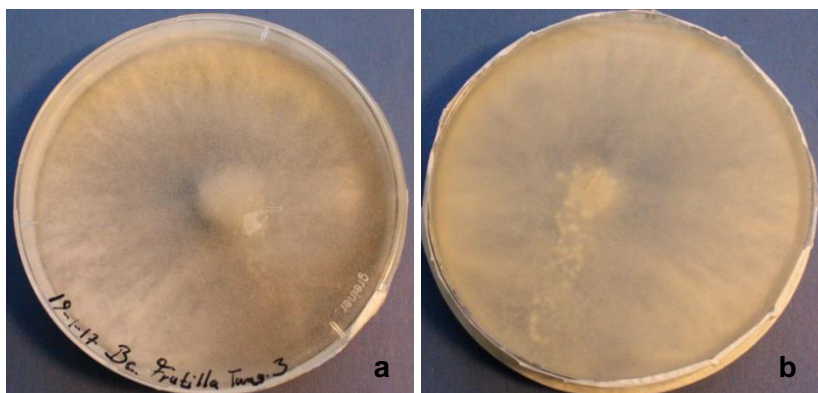


Figura 7. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-3) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia

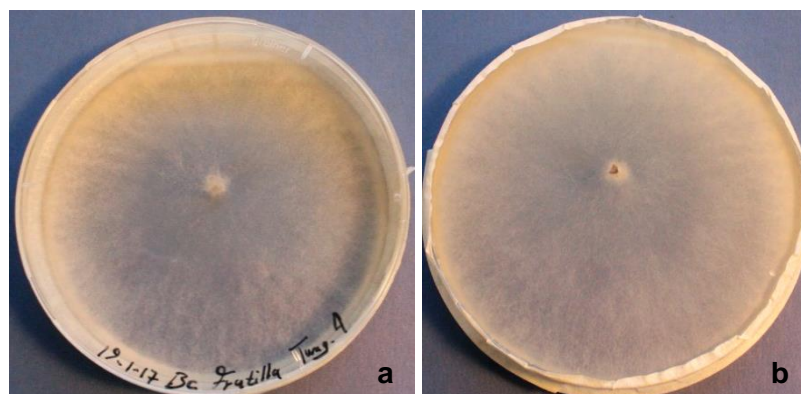


Figura 8. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-4) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia

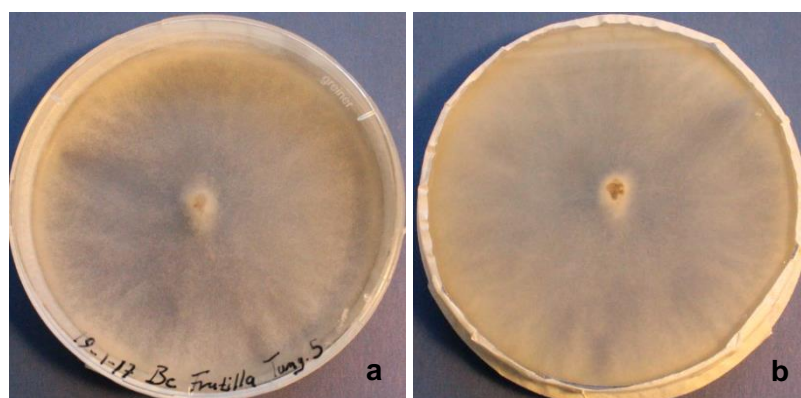


Figura 9. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-5) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.

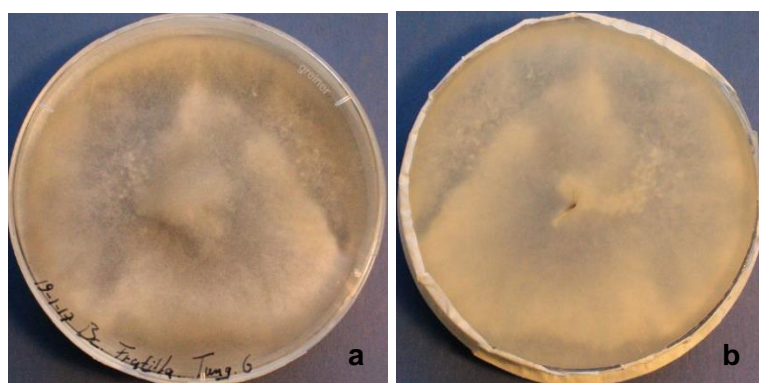


Figura 10. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-6) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.

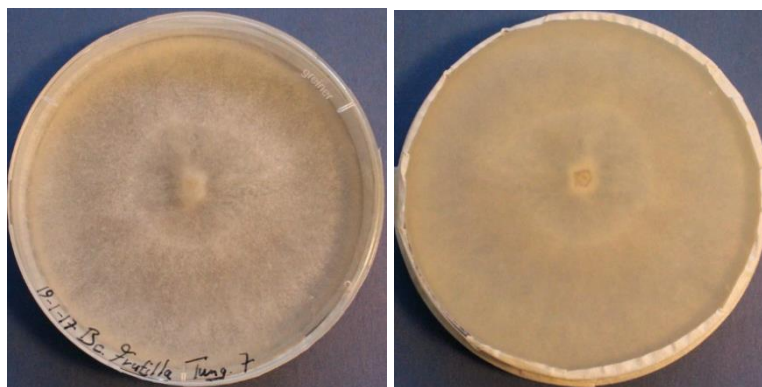


Figura 11. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-7) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.

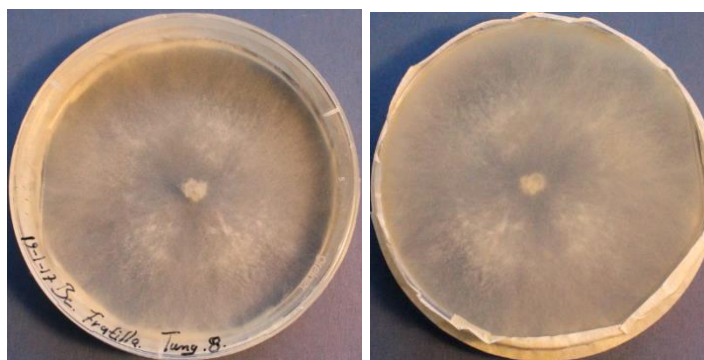


Figura 12. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-8) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia.

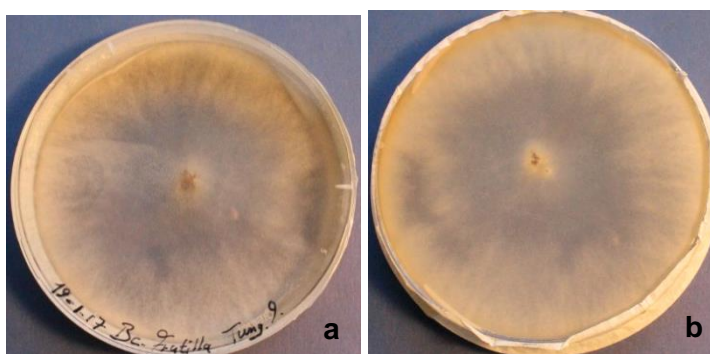


Figura 13. Crecimiento de colonia de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc-9) donde a) Anverso de la colonia y b) Reverso de la colonia

Asadollahi, Fekete, Karaffa, Flippi, Árnýasi, Esmaeil y Sándor, (2013) de modo similar a nuestro trabajo lograron obtener aislados monospóricos de *B. cinerea* mediante el de cultivo conidios germinados en agar agua y transferidos al medio de cultivo PDA. Sin embargo, estos autores utilizaron diferentes cultivos hospedantes para realizar los aislamientos mientras que en nuestro trabajo solo utilizamos el cv de frutilla Albeon.

Como resultado del presente estudio se obtuvieron 9 aislados de *B. cinerea* los cuales fueron conservados en tubos con medio de cultivo PDA inclinados a una temperatura aproximada de 4°C.

Por otra parte, Johnston, Hoksbergen, Park & Beever, (2014) insistieron en lo importante de mantener colecciones de *B. cinerea* debido a su relevancia para estudios genéticos ya que estos aislados pueden ser fuente de variabilidad temporal y regional en cultivos de interés económicos que sean afectados por este importante patógeno. Esta colección es la primera de su tipo en la ESPOCH y su creación permitirá futuros estudios sobre patogenicidad, agresividad, así como susceptibilidad frente a diversas moléculas con efecto fungicidas.

B. INFLUENCIA DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN EN EL DESARROLLO DE SÍNTOMAS DE *B. cinerea* EN FRUTOS DE FRUTILLA EN CONDICIONES CONTROLADAS.

1. Método de inmersión sin punción

A las 24 h no existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas en relación con el control agua estéril (cuadro 2).

Cuadro 2. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 24 h posteriores a la inoculación artificial.

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-2	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-3	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-4	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-5	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-6	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-7	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-8	0	51.00
CC-ESPOCH-Bc-9	0	51.00
Control agua	0	51.00

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 48 h no existieron diferencias significativas entre las cepas en relación con el control (agua estéril). No se observó la presencia de síntomas en los frutos inoculados (cuadro 3).

Cuadro 3. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 48 h posteriores a la inoculación artificial

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-2	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-3	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-4	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-5	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-6	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-7	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-8	0	51,00
CC-ESPOCH-Bc-9	0	51,00
Control (agua estéril)	0	51,00

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 72 h no existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas en relación con el control agua estéril. No se observó la presencia de síntomas en los frutos inoculados (cuadro 4).

Cuadro 4. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 72 h posteriores a la inoculación artificial.

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0.11	45.05
CC-ESPOCH-Bc-2	0	40.00
CC-ESPOCH-Bc-3	0	40.00
CC-ESPOCH-Bc-4	0.20	50.10
CC-ESPOCH-Bc-5	0.20	50.10
CC-ESPOCH-Bc-6	0.70	75.35
CC-ESPOCH-Bc-7	0.30	55.15
CC-ESPOCH-Bc-8	0.30	55.15
CC-ESPOCH-Bc-9	0.40	60.20
Control agua	0	40.00

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

El aislado CC-Bc-ESPOCH 6 fue el que mayor avance en desarrollo de los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon mostró a las 96h posteriores a la inoculación artificial. Sin embargo, no difirió estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 4 y CC-Bc-ESPOCH 7 (cuadro 5)

Cuadro 5. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 96 h posteriores a la inoculación artificial.

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0. 67	46.80 bc
CC-ESPOCH-Bc-2	0.70	52.05 bc
CC-ESPOCH-Bc-3	0. 10	30.35 c
CC-ESPOCH-Bc-4	1.00	62.20 ab
CC-ESPOCH-Bc-5	0.50	42.95 bc
CC-ESPOCH-Bc-6	1.60	78.30 a
CC-ESPOCH-Bc-7	1.00	60.80 ab
CC-ESPOCH-Bc-8	0.70	49.25 bc
CC-ESPOCH-Bc-9	1.10	63.25 ab
Control agua	0	26.50 c

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

El aislado CC-Bc-ESPOCH 6 fue quien mayor avance en desarrollo de los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon mostró a las 120 h posteriores a la inoculación artificial. Sin embargo, no difirió estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 4 y CC-Bc-ESPOCH 7 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 120 h posteriores a la inoculación artificial

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	1.56	53.20 b
CC-ESPOCH-Bc-2	1.60	55.45 b
CC-ESPOCH-Bc-3	0.40	25.65 cd
CC-ESPOCH-Bc-4	1.90	62.60 ab
CC-ESPOCH-Bc-5	1.10	43.05 bc
CC-ESPOCH-Bc-6	2.50	77.20 a
CC-ESPOCH-Bc-7	1.90	62.70 ab
CC-ESPOCH-Bc-8	1.60	55.65 b
CC-ESPOCH-Bc-9	1.90	62.55 ab
Control agua	0	15.50 d

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

El aislado CC-Bc-ESPOCH 6 fue quien mayor avance en desarrollo de los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon mostró a las 144 h posteriores a la inoculación artificial. Sin embargo, no difirió estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 4 y CC-Bc-ESPOCH 7 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 7).

Cuadro 7. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 144 h posteriores a la inoculación artificial

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	2.56	54.15 b
CC-ESPOCH-Bc-2	2.60	56.40 b
CC-ESPOCH-Bc-3	1.10	27.80 cd
CC-ESPOCH-Bc-4	2.80	62.05 ab
CC-ESPOCH-Bc-5	2.00	45.35 bc
CC-ESPOCH-Bc-6	3.50	78.15 a
CC-ESPOCH-Bc-7	2.80	62.15 ab
CC-ESPOCH-Bc-8	2.60	56.60 b
CC-ESPOCH-Bc-9	2.70	61.45 ab
Control agua	0	10.00 d

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

El aislado CC-Bc-ESPOCH 6 fue quien mayor avance en desarrollo de los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon mostró a las 168 h posteriores a la inoculación artificial. Sin embargo, no difirió estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 1, CC-Bc-ESPOCH 2, CC-Bc-ESPOCH 4, CC-Bc-ESPOCH, CC-Bc-ESPOCH 7, CC-Bc-ESPOCH 8 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 8).

Cuadro 8. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 168 h posteriores a la inoculación artificial.

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	3.44	58.75 ab
CC-ESPOCH-Bc-2	3.30	57.00 ab
CC-ESPOCH-Bc-3	1.80	30.70 c
CC-ESPOCH-Bc-4	3.40	61.40 ab
CC-ESPOCH-Bc-5	3.00	48.25 bc
CC-ESPOCH-Bc-6	3.80	72.75 a
CC-ESPOCH-Bc-7	3.40	61.40 ab
CC-ESPOCH-Bc-8	3.30	55.25 ab
CC-ESPOCH-Bc-9	3.20	61.35 ab
Control agua	0	7.50 d

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 192 h posterior a la inoculación artificial no existió diferencia entre los aislados de *B. cinerea* a excepción del aislado CC-Bc-ESPOCH 3 quien fue quien mostró el desarrollo más lento de los síntomas sobre los frutos *F. vesca* cv. Albeon (cuadro 9).

Cuadro 9. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 192 h posteriores a la inoculación artificial

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	3.89	58.50 a
CC-ESPOCH-Bc-2	3.80	58.50 a
CC-ESPOCH-Bc-3	2.70	30.10 b
CC-ESPOCH-Bc-4	3.80	61.85 a
CC-ESPOCH-Bc-5	3.70	54.25 ab
CC-ESPOCH-Bc-6	4.00	67.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	3.70	57.60 a
CC-ESPOCH-Bc-8	3.90	62.75 a
CC-ESPOCH-Bc-9	3.60	57.40 a
Control agua	0	6.50 c

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 216 h posterior a la inoculación artificial sobre los frutos *F. vesca* cv. Albeon no existieron diferencias significativas entre los aislados de *B. cinerea* (cuadro 10).

Cuadro 10. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 216 h posteriores a la inoculación artificial.

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	4.00	59.00 a
CC-ESPOCH-Bc-2	4.00	59.00 a
CC-ESPOCH-Bc-3	3.50	49.70 a
CC-ESPOCH-Bc-4	3.90	54.60 a
CC-ESPOCH-Bc-5	4.00	59.00 a
CC-ESPOCH-Bc-6	4.00	59.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	3.90	54.60 a
CC-ESPOCH-Bc-8	4.00	59.00 a
CC-ESPOCH-Bc-9	3.90	54.60 a
Control agua	0	6.00 b

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

2. Discusión ensayo de patogenicidad

B. cinerea dispone de varios factores de patogenicidad y virulencia como la producción de toxinas que matan las células del huésped, producen especies reactivas de oxígeno que causan un estrés oxidativo en los tejidos atacados, pueden producir enzimas hidrolíticas que pueden degradar la cutícula así como la lamela media de las células vegetales (Choquer, Fournier, Kunz, Levis, Pradier, Simon & Viaud, 2007).

Kerssies, Bosker-van Zessen, Wagemakers, & Van Kan, (1997) lograron determinar variabilidad patogénica entre aislados monospóricos de *B. cinerea* que fueron aislado de muestras dentro y fuera de invernaderos donde se cultivaban rosas. Estos autores, aunque trabajaron con un hospedante diferente al nuestro pero sus resultados fueron similares ya que obtuvieron variabilidad en la patogenicidad y agresividad de sus aislados.

Autores como Shao, Yang, Zhang, Ren, & Chen, (2015) demostraron mediante un ensayo de patogenicidad similar al utilizado en nuestro trabajo que la presencia del gen BcStr2 estuvo relacionado con la biosíntesis de metionina, la diferenciación vegetativa, la tolerancia a estrés múltiple y con la virulencia de los aislados de *B. cinerea*.

Este constituye el primer trabajo donde se demuestra la variabilidad patogénica entre aislados de *B. cinerea* obtenidos a partir de frutos con síntomas de pudrición gris del cv. Abeon de frutilla. Este aspecto sienta las bases para realizar estudios futuros donde se podrían a nivel bioquímico y molecular identificar los determinantes de agresividad y los factores de patogenicidad determinados en condiciones de laboratorio.

3. Método de punción e inmersión

A las 24h no existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión (cuadro 11).

Cuadro 11. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 24 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción.

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-2	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-3	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-4	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-5	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-6	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-7	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-8	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-9	0	25.50
Control agua	0	25.50

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 48 h no existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión (cuadro 12).

Cuadro 12. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 48 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción

Cepas	Medias reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-2	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-3	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-4	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-5	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-6	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-7	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-8	0	25.50
CC-ESPOCH-Bc-9	0	25.50
Control agua	0	25.50

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 72h existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión (cuadro 13). Los aislados CC-Bc-ESPOCH 6, CC-Bc-ESPOCH 7 y CC-Bc-ESPOCH 8 fueron quienes mayor avance mostraron en el desarrollo de los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon. Sin embargo, no difirieron estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 2, CC-Bc-ESPOCH 3, CC-Bc-ESPOCH 4, CC-Bc-ESPOCH 5 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 13).

Cuadro 13. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 72 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción.

Aislados	Media reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0.25	14.00 bc
CC-ESPOCH-Bc-2	0.60	24.00 abc
CC-ESPOCH-Bc-3	0.40	19.00 abc
CC-ESPOCH-Bc-4	1.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-5	0.60	24.00 abc
CC-ESPOCH-Bc-6	1.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	1.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-8	1.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-9	0.80	29.00 abc
Control agua	0	9.00 c

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 96h existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión. Los aislados CC-Bc-ESPOCH 4, CC-Bc-ESPOCH 6, CC-Bc-ESPOCH 7 y CC-Bc-ESPOCH 8 desarrollaron con mayor rapidez los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon. Sin embargo, no difirieron estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 2, CC-Bc-ESPOCH 3, CC-Bc-ESPOCH 5 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 14).

Cuadro 14. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 96 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción.

Aislados	Media reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	0.75	12.50 bc
CC-ESPOCH-Bc-2	1.40	24.10 ab
CC-ESPOCH-Bc-3	1.40	21.70 ab
CC-ESPOCH-Bc-4	2.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-5	1.60	25.80 ab
CC-ESPOCH-Bc-6	2.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	2.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-8	2.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-9	1.80	29.90 ab
Control agua	0	5.00 bc

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 120 h existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión. Los aislados CC-Bc-ESPOCH 4, CC-Bc-ESPOCH 6, CC-Bc-ESPOCH 7 y CC-Bc-ESPOCH 8 desarrollaron con mayor rapidez los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon con el método de punción e inmersión. Sin embargo, no difirieron estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 2, CC-Bc-ESPOCH 3, CC-Bc-ESPOCH 5 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 15).

Cuadro 15. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 120 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción.

Aislados	Media reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	1.50	12.80 bc
CC-ESPOCH-Bc-2	2.40	24.80 abc
CC-ESPOCH-Bc-3	2.40	21.70 abc
CC-ESPOCH-Bc-4	3.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-5	2.60	25.80 ab
CC-ESPOCH-Bc-6	3.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	3.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-8	3.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-9	2.80	29.90 ab
Control agua	0	4.00 c

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 144 h existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión. Los aislados CC-Bc-ESPOCH 4, CC-Bc-ESPOCH 6, CC-Bc-ESPOCH 7 y CC-Bc-ESPOCH 8 desarrollaron con mayor rapidez los síntomas sobre frutos de *F. vesca* cv. Albeon con el método de punción e inmersión. Sin embargo, no difirieron estadísticamente de los aislados CC-Bc-ESPOCH 2, CC-Bc-ESPOCH 3, CC-Bc-ESPOCH 5 y CC-Bc-ESPOCH 9 (cuadro 16).

Cuadro 16. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 144 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción.

Aislados	Media reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	2.50	13.80 bc
CC-ESPOCH-Bc-2	3.40	24.80 ab
CC-ESPOCH-Bc-3	3.40	21.70 abc
CC-ESPOCH-Bc-4	4.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-5	3.60	25.80 ab
CC-ESPOCH-Bc-6	4.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	4.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-8	4.00	34.00 a
CC-ESPOCH-Bc-9	3.80	29.90 ab
Control agua	0	3.00 c

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 168 h no existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión (cuadro 17).

Cuadro 17. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 168 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción.

Aislados	Media reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-2	3.80	24.00 a
CC-ESPOCH-Bc-3	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-4	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-5	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-6	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-7	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-8	4.00	28.50 a
CC-ESPOCH-Bc-9	4.00	28.50 a
Control agua	0	3.00 b

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$

A las 192h no existieron diferencias significativas entre las cepas inoculadas mediante el método con punción inmersión (cuadro 18).

Cuadro 18. Evaluación de patogenicidad de aislados de *B. cinerea* en frutos de *F. vesca* cv. Albeon 192 h posteriores a la inoculación artificial mediante punción

Aislados	Media reales	Rango promedio
CC-ESPOCH-Bc-1	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-2	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-3	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-4	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-5	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-6	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-7	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-8	4.00	28.00 a
CC-ESPOCH-Bc-9	4.00	28.00 a
Control agua	0	3.00 b

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=10$



Thorpe y Hall (1984) utilizaron el método de inoculación utilizando daños mecánicos y colocar gotas de suspensión de conidio en los órganos inoculados. A diferencia de nuestro trabajo estos autores en nuestro trabajo se realizaron punciones a nivel de los frutos de frutilla y posteriormente fueron sumergidos en una suspensión de conidios. Sin embargo, a pesar de lograr observar diferencias en la agresividad entre aislados, consideramos que este método no fue tan resolutivo al compararlo con el método de inmersión en suspensión

conidial sin infringir daños mecánicos al fruto donde, pues en este último se apreció mayor diferenciación en la agresividad de los aislados de *B. cinerea* durante las evaluaciones.

1. Desarrollo de una escala diagramática cuantitativa para la evaluación de la magnitud de los daños causados por *B. cinerea*

En base a los síntomas observados en los ensayos de inoculación tanto con punción como si esta, se lograron registrar síntomas en diferentes niveles de desarrollo y evolución. Con estas observaciones se logró confeccionar la siguiente escala de evaluación con su correspondencia visual en cada grado (cuadro 19).

Cuadro 19. Escala diagramática cuantitativa para la evaluación de la magnitud de los daños causados por *B. cinerea* basada en la sintomatología observada en los ensayos de inoculación artificial

Grado	Descripción	Correspondencia visual
0	Fruto sin síntomas	
1	Menor de ¼ del fruto con síntomas	

2De $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ del fruto con síntomas

3De $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ del fruto con síntomas

4Más del $\frac{3}{4}$ del fruto con síntomas

B. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE LOS FUNGICIDAS USADOS EN EL CONTROL QUÍMICO DE *B. CINEREA*

1. Susceptibilidad *in vitro* de Iprodione frente *B. cinerea*.

En todas las concentraciones de Iprodione ensayadas se observó una inhibición del 100% del crecimiento micelial de *B. cinerea* hasta las 72 horas posteriores al montaje del ensayo de susceptibilidad. Sin embargo, a las 96 y 120 horas las concentraciones de 4x, 2x y 1x redujeron el crecimiento micelial del hongo en un 100% mientras que en las concentraciones restantes comenzó a observarse un lento crecimiento filamentoso.

Finalmente, a las 144 horas todas las concentraciones inhibieron el crecimiento micelial de *B. cinera* en relación con el control sin ingrediente activo, pero en todas se observó un lento crecimiento (cuadro 20).

Cuadro 20. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad in vitro del Iprodione a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 b	0 b	0 b	0 d	1.75 bc	5.25 b
2x	0 b	0 b	0 b	0 d	0.38 c	2.75 b
1x	0 b	0 b	0 b	0 d	0.25 c	3.00 b
0.5x	0 b	0 b	0 b	0.63 c	3.00 b	3.25 b
0.25x	0 b	0 b	0 b	1.50 b	4.13 b	4.50 b
Control	5.47 a	14.73 a	24.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

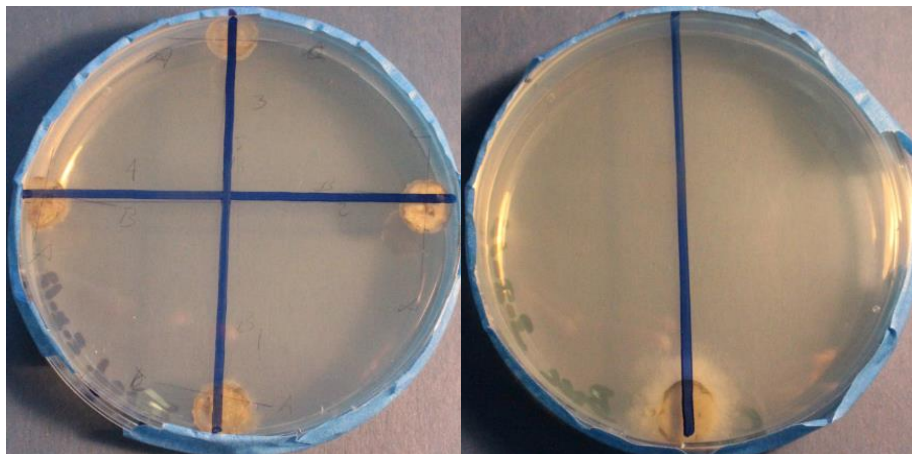


Figura 14. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Iprodione a las 24 horas concentración 1x.

Varios autores han demostrado que el uso de ensayo de susceptibilidad *in vitro* ha sido oportuno en la identificación y caracterización de aislados de *B. cinerea*, así como en la identificación de mutantes resistentes al Iprodione (Fernández-Ortuño, Grabke, Li & Schnabel, 2015). En ensayos de susceptibilidad *in vitro* se ha demostrado que la resistencia de *B. cinerea* al iprodione no radica en la toma y subsiguiente metabolismo del fungicida sino en que en algunos mutantes resistentes los niveles de las enzimas responsables de decodificar radicales periódicos (Steel y Naira, 1993).

Wedge, Curry, Kreiser, Curry, Abril & Smith, (2013) mediante un ensayo de susceptibilidad *in vitro* lograron demostrar la presencia de aislados de *B. cinerea* resistentes al iprodione en 13 aislados obtenidos de campos de fresa ubicados en el sudeste de Louisiana en EEUU. A diferencia de estos autores el aislado nuestro seleccionado para los estudios de sensibilidad *in vitro* fue sensible a todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, a partir de las 96 horas en las concentraciones más bajas se apreció un lento crecimiento del micelio.

2. Susceptibilidad in vitro de Pyrimetanil frente *B. cinérea*

La concentración de 4x de Pyrimetanil inhibió el 100% del crecimiento micelial de *B. cinerea* en todas las evaluaciones. Desde las 24 horas las concentraciones de 1x, 0.5x y 0.25x se observó crecimiento micelial similar al control por lo que en esta evaluación no se apreció una inhibición del crecimiento micelial del hongo. En el resto de las evaluaciones a pesar de que se observó inhibición del crecimiento micelial al comparar con el control sin ingrediente activo, sin embargo, se apreció un lento crecimiento filamentoso (cuadro 21, figura 15).

Cuadro 21. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Pyrimetanil a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 c	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
2x	0 c	1.13 c	2.00 c	3.13 c	4.75 c	5.75 c
1x	2.38 b	3.38 bc	5.00 bc	6.88 bc	9.50 b	11.88 b
0.5x	4.00 ab	5.00 b	6.38 b	9.00 b	10.88 b	15.38 b
0.25x	5.63 a	6.75 b	7.88 b	10.00 b	12.38 b	13.25 b
Control	5.47 a	14.73 a	24.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

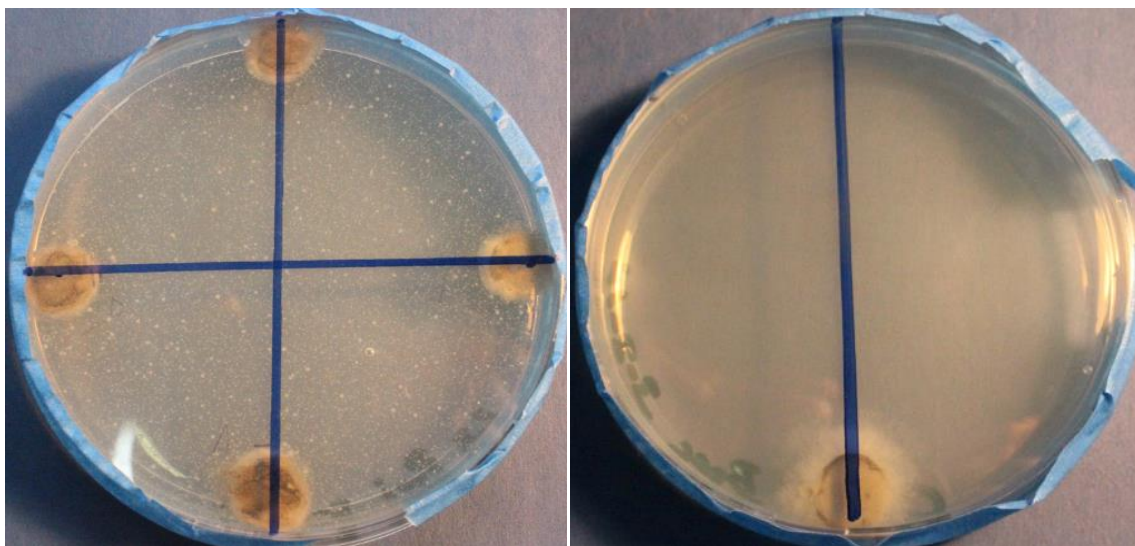


Figura 15. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Pyrimetanil a las 24 horas concentración 1x.

Una observación interesante se pudo constatar a las 24 horas debido a la presencia de halos de aclaramiento en el medio de cultivo envenenado con Pyrimetanil, lo cual pudo estar motivado por algún tipo de actividad enzimática detoxificadora de *B. cinerea* y que es difusible (figura 16).

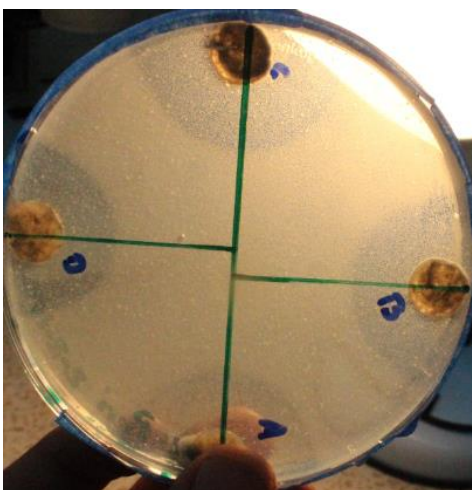


Figura 16. *B. cinerea* causando halos de difusión y aclaramiento del medio de cultivo envenenado con Pyrimetanil a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4)

Autores como Yan, Jurick, Lou, Gaskins, & Kim, (2014) mediante ensayos de susceptibilidad *in vitro* informaron por primera vez la presencia de resistencia en aislados de *B. cinerea* al Pyrimetanil en manzanas almacenadas. A diferencia de estos autores en nuestro trabajo se utilizó un ensayo similar pero todas las concentraciones de Pyrimetanil inhibieron el crecimiento micelial de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4).

3. Susceptibilidad *in vitro* de Procimidone frente *B. cinerea*.

A las 24 horas la dosis de 4x fue la que mayor inhibición del crecimiento micelial produjo, aunque el resto de las dosis lograron inhibir en más de un 74.77% al compararla con el control sin ingrediente activo. En el resto de las evaluaciones no existió diferencia entre las dosis en relación con el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, el cual siempre fue superior al 85% (cuadro 22, figura 17).

Cuadro 22. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Procimidone a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0.13 d	2.38 b	3.50 b	5.75 b	6.88 b	9.25 b
2x	0.38 bc	2.13 b	3.00 b	4.75 b	6.25 b	7.63 b
1x	0.25 cd	1.50 b	3.50 b	5.88 b	6.63 b	7.75 b
0.5x	0.50 b	1.63 b	2.63 b	4.38 b	6.50 b	8.00 b
0.25x	1.38 b	2.13 b	2.88 b	3.75 b	5.00 b	6.00 b
Control	5.47 a	14.73 a	24.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

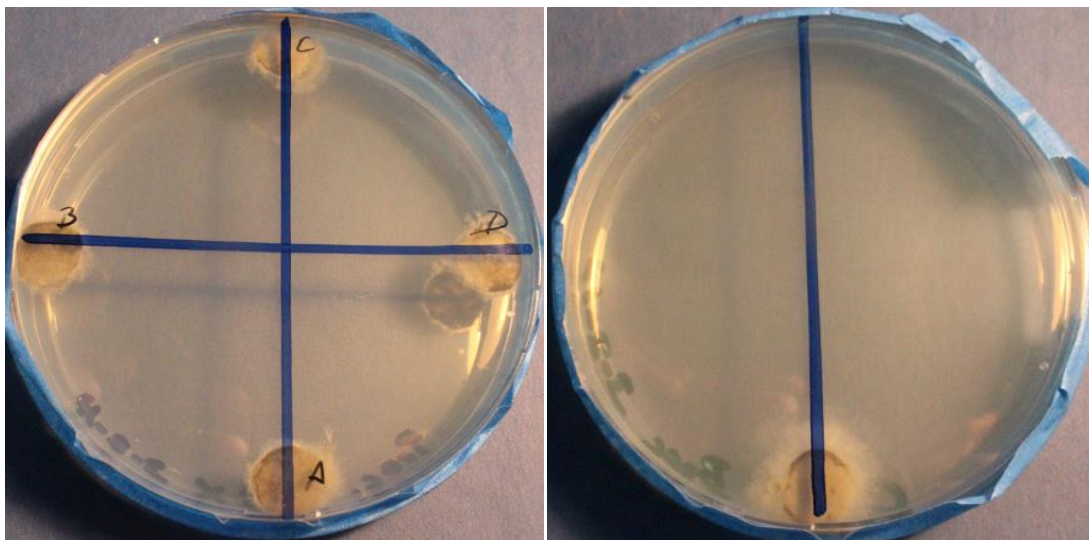


Figura 17. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Procimidone.

En la literatura científica consultada no encontramos trabajos donde se haya ensayado *in vitro* la susceptibilidad de *B. cinerea* frente al ingrediente activo Procimidone.

4. Susceptibilidad *in vitro* de Boscalid frente *B. cinerea*

El Boscalid logró inhibir el 100% del crecimiento micelial de *B. cinerea* a las 24 y 48 horas. A las 72 y 96 horas no existieron diferencias significativas entre las dosis, sin embargo, lograron reducimiento del hongo en más del 86.96 % y 84.33% respectivamente al compararlos con el crecimiento observado en el control sin presencia de ingrediente activo (cuadro 23, figura 18).

Cuadro 23. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Boscalid a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 b	0 b	1.38 b	3.25 b	3.75 c	7.63 c
2x	0 b	0 b	2.13 b	5.63 b	6.13 b	11.38 b
1x	0 b	0 b	2.13 b	4.88 b	6.00 b	9.63 bc
0.5x	0 b	0 b	3.25 b	5.63 b	6.75 b	12.63 b
0.25x	0 b	0 b	3.25 b	4.38 b	6.25 b	12.25 b
Control	5.47 a	14.73 a	24.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

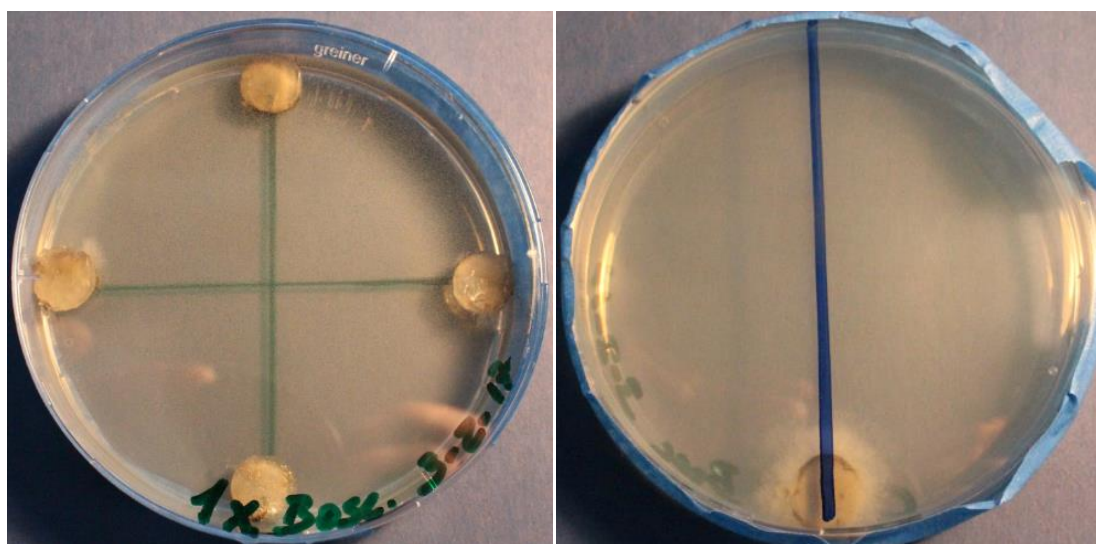


Figura 18. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Boscalid

Autores como Zhang, Yuan, Sun, Qi, Zhou & Zhu, (2007) en ensayos de susceptibilidad *in vitro* aislaron cepas que fueron resistentes al Boscalid en cultivos vegetales desarrollados bajo condicione de invernadero. En nuestros ensayos este producto logró inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* a pesar que a partir de las 72 horas el hongo puedo crecer lentamente en el medio de cultivo envenenado con este ingrediente activo.

5. Susceptibilidad in vitro del iodocitrato de cobre frente *B. cinérea*

La dosis de 4x inhibió en un 100% el crecimiento micelial de *B. cinerea* en todas las evaluaciones realizadas, siendo la dosis de mayor efectividad del ensayo de susceptibilidad in vitro. A las 24 y 48 horas en todas las concentraciones se obtuvo un 100% de inhibición del crecimiento del hongo. A las 72 horas todas las concentraciones produjeron inhibición del crecimiento micelial sin que existieran diferencias estadísticas significativas entre ellas. En esta evaluación la inhibición fue superior al 97% en todas las concentraciones utilizadas. A las 96 y 120 horas el crecimiento micelial se inhibió en más de un 91.60 % y 93.74% respectivamente. Finalmente, a las 144 horas la inhibición del crecimiento micelial fue superior al 86.53% en relación con el crecimiento observado en el control sin ingrediente activo (cuadro 24, figura 19).

Cuadro 24. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del iodocitrato de cobre a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 b	0 b	0 b	0 d	0 d	0 e
2x	0 b	0 b	0.38 b	1.13 bc	4.25 b	8.38 bc
1x	0 b	0 b	0.25 b	0.50 c	0.50 c	1.88 d
0.5x	0 b	0 b	0.13 b	2.25 b	3.50 b	5.00 c
0.25x	0 b	0 b	0.25 b	2.25 b	2.50 bc	3.00 cd
Control	5.47 a	14.73 a	14.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

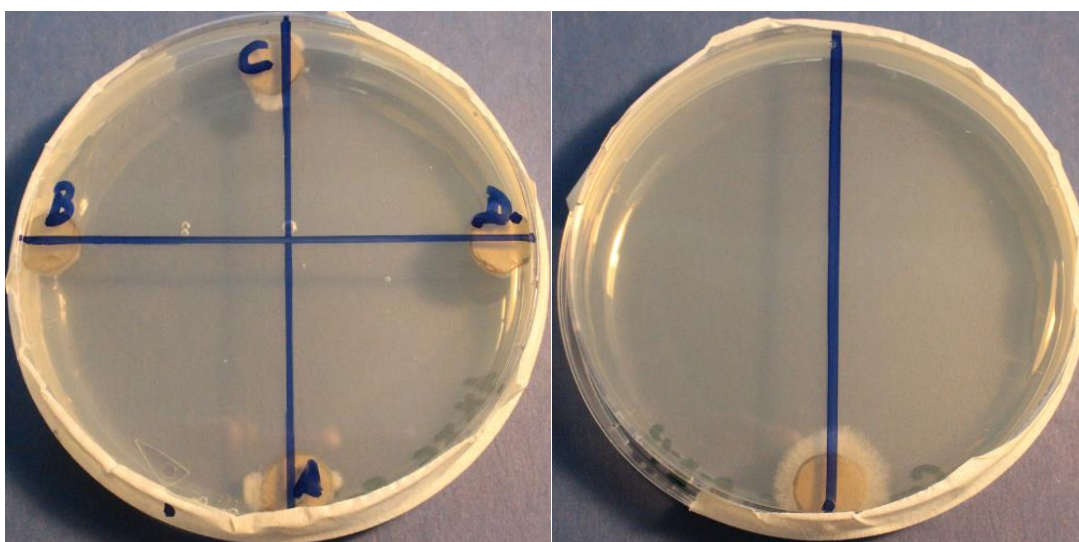


Figura 19. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del iodocitrato de cobre

En la literatura científica relacionada con el tema ensayo de susceptibilidad *in vitro* no se encontró algún artículo donde se haya ensayado el iodocitrato de cobre para determinar la susceptibilidad *in vitro* de *B. cinerea* frente a este ingrediente activo. Acorde con los resultados obtenidos en presente trabajo valoramos a este ingrediente activo como un excelente botricida y recomendamos evaluar su efectividad en condiciones de campo.

6. Susceptibilidad *in vitro* del Carbendazim frente *B. cinerea*.

El Carbendazim a las 24 horas en todas sus dosis inhibió en un 100% el crecimiento de *B. cinerea*. A las 48 horas se redujo el crecimiento micelial en más del 72.84%. Sin embargo, a las 72 horas el crecimiento del hongo se inhibió en más del 45.61% en todas las dosis usadas. A las 96 horas se redujo el crecimiento micelial en más del 52.60%, mientras que a las 120 horas fue superior al 56.76%. Finalmente, a las 144 horas la inhibición del crecimiento micelial fue superior al 61.61% en relación con el control (cuadro 25, figura 20).

Cuadro 25. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Carbendazim a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 b	0 c	0.38 d	1.50 c	2.50 c	3.13 c
2x	0 b	0 c	2.94 c	6.13 c	10.88 bc	16.00 b
1x	0 b	1.50 bc	9.13 bc	17.00 b	19.88 b	20.63 b
0.5x	0 b	4.00 b	13.56 b	18.63 b	21.88 b	23.88 b
0.25x	0 b	3.50 b	7.88 bc	12.63 bc	15.38 bc	15.63 b
Control	5.47 a	14.73 a	24.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

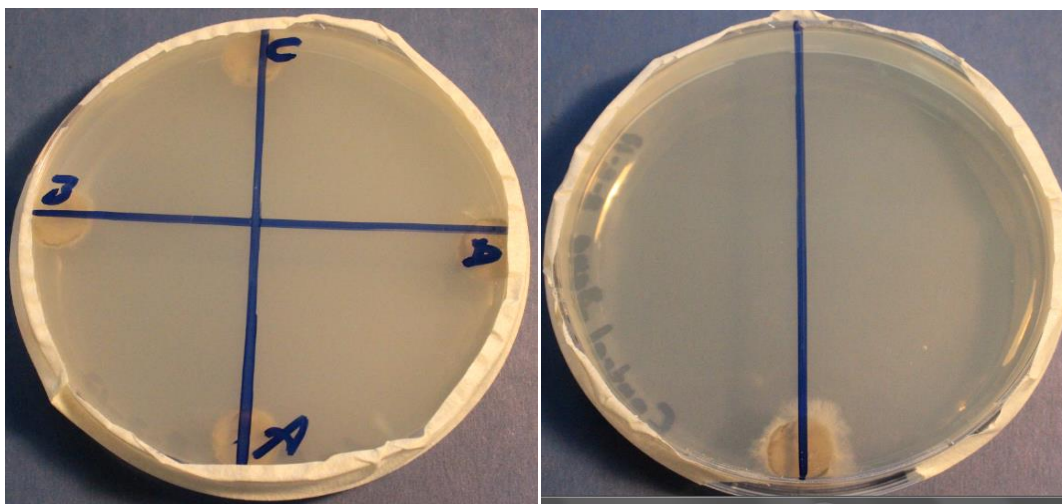


Figura 20. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Carbendazim

En relación con el ingrediente activo carbendazim autores como Liu, Che & Chen, (2016) encontraron resistencia a este ingrediente activo en aislados de *B. cinerea* que afectaban plantas de tomate en más de 87 invernaderos en una región de China de la provincia Henan. Estos autores utilizaron los ensayos de sensibilidad *in vitro* para evaluar la susceptibilidad de los aislados de este agente fitopatógeno frente a diferentes productos fungicidas comerciales. Por otra parte, Leroy, Plesken, Weber, Kauff, Scalliet & Hahn, (2013) al analizar una amplia población de aislados de *B. cinerea* de campos comerciales de frutilla en Alemania encontraron aislados que poseían resistencia a múltiples fungicidas.

7. Susceptibilidad *in vitro* del Fluodoxinil + Ciprodinil frente *B. cinérea*

Los ingredientes activos Fluodoxinil y Ciprodinil, componentes ambos del producto comercial SWITCH® 62.5 WG lograron inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* en un 100 % en todas las concentraciones y durante todas las evaluaciones realizadas (cuadro 26, figura 21). En ninguna de las placas Petri se logró observar crecimiento micelial por encima de la superficie del medio de cultivo envenenado con este producto.

Cuadro 26. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del fluodoxinil + ciprodinil a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
2x	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
1x	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
0.5x	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
0.25x	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
Control	5.47 a	14.73 a	24.93 a	35.92 a	50.60 a	62.20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

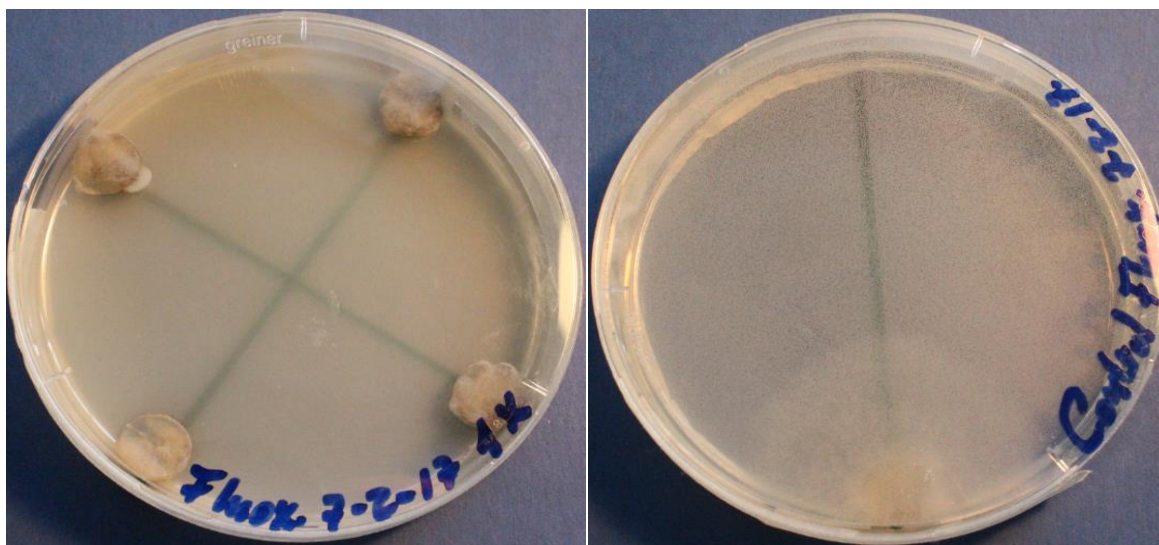


Figura 21. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del fluodoxinil + ciprodinil

Fernández-Ortuño, Chen & Schnabel, (2013) mediante ensayos de susceptibilidad *in vitro* lograron detectar resistencia al ciprodinil mientras que al fludioxonil no lo encontraron en los aislados de *B. cinerea* procedentes del cultivo de fresa en la región norte y Sur de Carolina, EEUU. Similarmente Li, Fernández-Ortuño, Grabke & Schnabel, (2014) detectaron la presencia de aislados de *B. cinerea* con leve y moderada resistencia al fludioxonil en frutilla. En nuestro ensayo en ninguna de las concentraciones ni evaluaciones se observó crecimiento micelial lo cual puede explicarse a que este producto en las condiciones productivas del Ecuador no es muy difundido debido a su alto precio, quizás por ello no se hayan detectado resistencia en *B. cinerea* causante de la pudrición gris del fruto de fresa.

8. Susceptibilidad in vitro del Tiofanato Metílico frente *B. cinerea*.

El Tiofanato metílico a las 24 horas su efecto inhibitor fue superior al 6.22 %. Al cabo de las 48 horas sólo se observó un efecto inhibitor del crecimiento de *B. cinerea* con las dosis de 4x y 2x. Pasadas las 72 horas la inhibición en todas las concentraciones fue superior en solo el 16,53 % en relación con el control. A las 96 horas el efecto inhibitorio del crecimiento micelial en todas las dosis fue superior al 31.79 %, mientras que a las 120 horas este fue mayor que el 42.92 %. Finalmente, a las 144 horas se logró un efecto inhibidos del crecimiento del hongo por encima del 51,77 % en relación con el con el control sin ingrediente activo (cuadro 27).

Cuadro 27. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Tiofanato Metílico a diferentes concentraciones

Concentraciones	Tiempo de evaluación (horas)					
	24	48	72	96	120	144
4x	0 b	0,88 d	4,31 c	7,75 c	16,50 c	20,50 c
2x	0,25 b	6,00 c	8,06 c	10,13 c	17,13 c	17,25 c
1x	4,50 a	16,25 a	19,00 b	21,75 b	26,63 bc	23,50 bc
0.5x	5,13 a	15,25 a	17,88 b	20,50 b	21,63 bc	23,13 bc
0.25x	5,13 a	17,13 a	20,81 b	24,50 b	28,88 b	30,00 b
Control	5,47 a	14,73 b	24,93 a	35,92 a	50,60 a	62,20 a

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

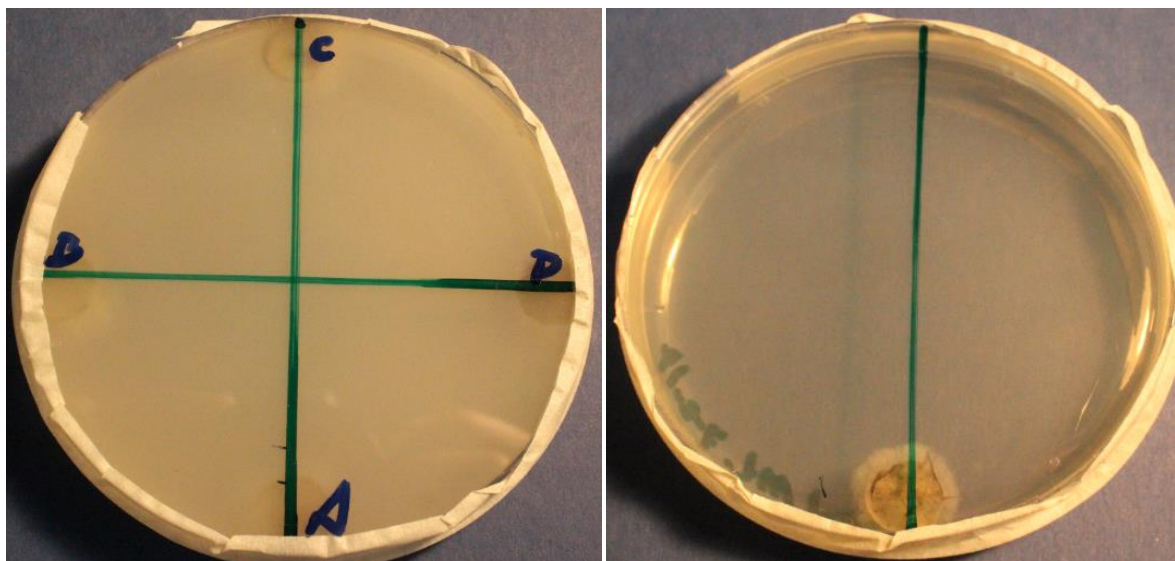


Figura 22. Inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* a las 24 horas a la concentración 1x (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) en un ensayo de susceptibilidad *in vitro* del Tiofanato Metílico.

Fernández-Ortuño y Schnabel (2012) mediante ensayos de susceptibilidad *in vitro* informaron por vez primera la presencia de aislados de *B. cinerea* resistentes al metil tiofanato. De todos los productos utilizados en nuestros ensayos este fue quien menor efecto inhibidor del crecimiento micelial de *B. cinerea* mostró. Esto puede estar motivado por el abuso del uso de este producto como botricida en las condiciones ecuatorianas y por el uso de dosis que superan lo recomendado por la ficha técnica del producto y por el incremento en la frecuencia de aplicación.

C. SELECCIÓN DE LOS FUNGICIDAS CON MAYOR EFECTO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO MICELIAL SOBRE *B. cinerea*.

Al comparar el efecto entre las ocho moléculas fungicidas se observaron diferencias significativas a las 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h (cuadro 28).

Cuadro 28. Uso de estadísticos de contraste Chi-cuadrado (no paramétrico) para comparar el efecto inhibidor del crecimiento micelial de diferentes ingredientes activos fungicidas sobre *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4)

Estadístico sobre contraste	Evaluaciones (horas, h)					
	24	48	72	96	120	144
Chi-cuadrado	1762,7a	1948,4b	2475,9c	1102,6d	1111,9e	833,0f
Grados de libertad	8	14	32	24	30	29
Significación asintótica	,000	,000	,000	,000	,000	,000

A las 24 h y 48 h los ingredientes activos que mayor efecto inhibidor sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) mostraron fueron: fluodioxonil + ciprodinil, iodocitrato de cobre, boscalid e Iprodione; sin diferencias estadísticas significativas entre ellos, pero si con el resto de las moléculas fungicidas ensayadas (cuadro 29).

A las 72 h los ingredientes activos que mayor efecto inhibidor sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) mostraron fueron: Fluodioxonil + Ciprodinil, iodocitrato de cobre e Iprodione; sin diferencias estadísticas significativas entre ellos, pero si con el resto de las moléculas fungicidas ensayadas (cuadro 29).

A las 96 h, 120 h y 144 h el ingrediente activo que mayor efecto inhibidor sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* (cepa CC-ESPOCH-Bc 4) mostraron fue el Fluodioxonil + Ciprodinil con diferencias estadísticas significativas con el resto de las moléculas fungicidas ensayadas (cuadro 29).

Cuadro 29. Comparación del efecto de inhibición del crecimiento micelial *B. cinerea* de diferentes ingredientes activos fungicidas mediante un ensayo de susceptibilidad *in vitro*

Ingredientes activos	Tiempo de evaluación (horas)					
	Rangos promedios					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Iprodione	145,50 d	116,00 d	83,50 d	81,25 d	102,51 d	114,24 e
Pyrimethanil	256,38 a	259,75 b	234,71 b	220,20 b	213,05 c	199,09cd
Procimidone	207,79 b	264,98 b	236,60 b	219,71 b	212,60 c	192,61 d
Boscalid	149,30 d	119,78 d	203,75 c	217,00 b	202,59 c	228,79 c
Fluodioxonil + Ciprodinil	145,50 d	116,00 d	83,50 d	65,00 e	58,50 e	54,00 f
Metil tiofanato	267,16 a	305,54 a	323,31 a	322,41 a	329,65 a	326,59 a
Benomil	161,88 c	210,46 c	261,58 b	273,48 a	273,28 b	268,34 b
Idocitrato de Cobre	145,50 d	116,00 d	98,78 d	112,73 c	116,16 d	120,43 e

Medias que en una misma columna que tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=8$

Acorde con este resultado se pone de manifiesto que el fungicida más efectivo para el contro *in vitro* de *B. cinerea* fue el Fluodioxonil + Ciprodinil, ingredientes activos del producto comercial SWITCH ® 62.5 WG, el cual no es muy utilizado por los productores ecuatorianos de frutilla debido a solo 500 gramos del producto tienes un valor superior a los 93-95 dólares y si se utiliza la dosis recomendado por los fabricantes alcanzaría para

preparar unos 500 litros que cubrirían aproximadamente media hectárea del cultivo de frutilla. Si tomamos en cuenta que este producto se orienta aplicar a intervalos de 7-10 días y que se recomienda combinar con otros ingredientes activos con diferente mecanismo de acción podemos comprender que solo estaría accesible a medianos y grandes productores que cuentan con los recursos económicos necesarios para sufragar estos gastos.

El fungicida Switch 62.5WG (Syngenta Crop Protection) ha sido un producto registrado desde el año 2001 como un efectivo producto para el control del moho gris de la frutilla. Como ingredientes activos contiene una anilino pirimidina (AP) llamada cyprodinil y un fenilpirrol (PP) conocido como fludioxonil. Ambos ingredientes activos son inhibidores sitios específicos por lo cual no se puede descartar la posibilidad real de que se desarrollen cepas resistentes. Aún se desconoce con detalles los modos de acción de este producto se afirma que el cyprodinil inhibe enzima Cistationina- β -liasa vinculada con la biosíntesis de metionina con lo cual se interrumpe el crecimiento del micelio de *B. cinerea* en la planta, mientras que el fludioxonil se relaciona con la fosforilación de la glucosa pues inhibe la proteína kinasa (MAP-kinasa) relacionada con eventos de señalización y osmoregulación a nivel hifal provoca una anormal acumulación de glicerol (Fernández-Ortuño, Chen & Schnabel, 2013; Li, Fernández-Ortuño, Grabke & Schnabel, 2014).

Este resultado constituye el primer informe para Ecuador en el estudio y evaluación de 8 productos fungicidas con acción botricida en el cultivo de la fresa, y basado en sus resultados se puede establecer un sistema de rotación de moléculas basados en los ensayos de susceptibilidad in vitro que permitan reducir el riesgo de fungoresistencia en condiciones de campo y con ello lograr con criterios técnicamente sustentados un manejo más efectivo de la pudrición gris del fruto de frutilla, lo cual reducirá notablemente el uso abusivo de fungicidas en condiciones de campo.

VI. CONCLUSIONES

- A. Los 9 aislados monospóricos de *B. cinerea* fueron patogénicos, aunque los más agresivos fueron los aislados CC-ESPOCH-Bc-6, CC-ESPOCH-Bc-4 y CC-ESPOCH-Bc-7.
- B. Los 8 fungicidas ensayados tuvieron efecto inhibidor del crecimiento micelial de *B. cinérea in vitro*.
- C. El fungicida más efectivo para el control *in vitro* de *B. cinerea* fue el Fluodioxonil + Ciprodinil, ingredientes activos del producto comercial SWITCH ® 62.5 WG.

VII. RECOMENDACIONES

- A. Realizar estudios de susceptibilidad *in vitro* con aislados monospóricos procedentes de otras provincias de la sierra ecuatoriana donde se cultive comercialmente frutilla.
- B. Incluir en los ensayos de susceptibilidad *in vitro* nuevos ingredientes activos con actividad botricida.
- C. Realizar ensayos de protección en campo con el Fluodioxonil + Ciprodinil para definir las dosis y frecuencia de aplicación más apropiadas.
- D. Evaluar programas de aplicación en condiciones de campo que combinen al Fluodioxonil + Ciprodinil, iodocitrato de cobre y el Iprodione.

VIII. RESUMEN

En la presente investigación propone: evaluar la patogenicidad y la susceptibilidad *in vitro* de fungicidas de *B. cinerea* para seleccionar productos con mayor efectividad en el control químico del moho gris en frutilla; obteniendo 9 aislados monopóricos de *Botrytis cinerea*, los cuales mostraron hifas septadas e hialinas, colonias grises, presencia de conidióforos surgidos directamente del micelio que sostenían en sus extremos numerosos conidios monocelulares. Asimismo, produjeron microesclerocios en microcultivos mientras que en cajas de Petri con medio de cultivo PDA desarrollaron esclerocios grandes de color negro a medida que envejecieron los cultivos. Todos los aislados fueron patogénicos, aunque los más agresivos fueron los aislados CC-ESPOCH-Bc-6, CC-ESPOCH-Bc-4 y CC-ESPOCH-Bc-7. Por otra parte los 8 ingredientes activos ensayados mostraron efecto inhibitor del crecimiento micelial de *B. cinerea* donde las concentraciones 4x, 2x y 1x fueron las que mayor efecto fungicida provocaron. El método de inmersión sin punción fue el que permitió una mejor diferenciación de la agresividad de los aislados, mientras que en el método con punción, el desarrollo de los síntomas fue muy rápido, pero menos resolutivo. Los fungicidas que contenían fluodoxinil + cyprodinil así como iodocitrato de cobre fueron los que mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* mostraron. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demostró que los aislados de *B. cinerea* fueron los causantes de la pudrición gris de los frutos de frutilla cv Albeon y que los 8 ingredientes activos mostraron actividad fungicida, aunque con diferentes efectos inhibitorios. En base a esta experiencia se podrá justificar cuales podrían ser las mejores rotaciones de moléculas a utilizar en campo y con ello reducir el riesgo del surgimiento de aislados resistentes para lograr una mejor protección fitosanitaria del cultivo de la frutilla.

Palabras clave: ANTI FÚNGICA, CONTROL QUÍMICO, CRECIMIENTO MICELIAL, PATÓGENO DE PLANTAS, FUNGICIDA.



IX. SUMMARY

The present research proposes: to evaluate the pathogenicity and susceptibility *in vitro* of fungicides of *B. cinerea* to select products with greater effectiveness in the chemical control of gray mold in straw; obtaining 9 monoporic isolates of *Botrytis cinerea*, which showed septate and hyaline hyphae, gray colonies, presence of conidiophores arising directly from the mycelium that supported at their ends numerous conidia as cellular. They also produced microsclerotia in microcultures while in petri dishes with PDA culture media they developed large black sclerotia as the cultures aged. All isolates were pathogenic, although the most aggressive isolates were CC-ESPOCH-Bs-6, CC-ESPOCH-Bc-4 and CC-ESPOCH-Bc-7. On the other hand, the 8 active ingredients tested showed inhibitory effect of the mycelial growth of *B. cinerea* where the concentrations 4x, 2x and 1x were the ones that had the greatest fungicidal effect. The method of immersion without puncture was the one that allowed a better differentiation of the aggressiveness of the isolates, whereas in the method with puncture, the development of the symptoms was very fast, but less resolute. The fungicides containing fluoxynil + ciprodinil as well as copper iodocitrate were the ones that had the best inhibitory effect on the mycelial growth of *B. cinerea* showed. With the results obtained in the research, it was demonstrated that the isolates of *B. cinerea* were the cause of the gray rot of the fruits of fruit cv Albeon and that the 8 active ingredients showed fungicidal activity, although with different inhibitory effects. Based on this experience it will be possible to justify what could be the best rotations of molecules to be used in the field and thus reduce the risk of the emergence of resistant isolates to achieve a better phytosanitary protection of the strawberry crop.

Keywords: ANTIFUNGAL, CHEMICAL CONTROL, MYCELIAL GROWTH, PLANT PATHOGEN, FUNGICIDE.



X. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Nicosia, M. G. L. D., Cacciola, S. O., & Schena, L (2016). Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs. PloS one, 11(8), e0160470. doi: 10.1371/journal.pone.0160470, 2016.
2. Agricense (2017). benomil 50 WP PD-FT-02 (01.01). Recuperado el 10 de febrero del 2017, de <http://agricense.com/agricense1/ft/Fungicidas/BENOMIL50WP.pdf>
3. Agrios, G (2005). Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic press, USA.P. 921.
4. Agrobrest (2010). Catálogo de productos orgánicos. Agricultura orgánica, biológica, ecológica, sustentable. Chimborazo - Ecuador. p. 7.
5. Agroes (2014). Descripción morfológica y ciclo vegetativo. Recuperado el 15 de noviembre de 2016, de: <http://www.agroes.es/cultivos-agricultura/cultivos-huerta-horticultura/colifor/353-fresa-y-el-freson-descripcion-morfologia-y-ciclo>.
6. Angelfire (2001). Cultivo de fresa. Recuperado de 15 de noviembre de 2016, de: <http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/fresa.htm> 2001.
7. Asadollahi, M., Fekete, E., Karaffa, L., Flipphi, M., Árnýasi, M., Esmaeili, M., & Sándor, E. (2013). Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants. *Microbiological research*, 168(6), 379-388.
8. Asproagro (2015). Sialex fungicida Recuperado el 17 noviembre de 2016, de <http://www.asproagro.com/-/wpcontent/uploads/2015/03/hojastecnicas/FICHA%>
9. Atalien (2017). Hoja de Seguridad – Benomyl 500 WP. Recuperado de 25 de noviembre de 2016, de: <http://www.antalien.net/modulos/productos/archivos/503732117-c86cdbc11dc5eb9e6879961.pdf>

10. Balmas, V. Santori, A., & Corazza, L. (2000). Le specie di *Fusarium* comini in Italia. Suggestimenti per il loro riconoscimento. Istituto per la Patologia vegetale. Petria, *Giornale di Patologia delle Piante*. Roma Vol. 10, Suppl.1. p. 60.
11. Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutita, O., & Karaoglanidis, G. S. (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest management science*, 66(9), 967-973.
12. Basf (2017). Collis Fungicida. Recuperado el 10 de febrero de 2017, de <http://eurofert.com.ec/downloads/-/HT%20COLLIS.pdf> BASF Ecuatoriana S.A
13. Bayer (2017). Scala fungicida. Recuperado el 10 de febrero de 2017, de: http://www.cropscience.bayer-.cl/upfiles/folleto/folleto_scala_lowres.pdf
14. Casaca, A. 2005 Características Botánicas del Cultivo de Fresa. Recuperado el 25 de noviembre de 2016, de: <http://hortintl.cals.ncsu.edu/es/articles/el-cultivo-de-la-fresa>
15. Chapeland, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M., & Leroux, P. (1999). Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64(2), 85-100.
16. Chirinos, H. (2013). Fertilización de la fresa Recuperado el 29 de noviembre de 2016, de: [http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/\\$webindex/69399A4146EAEC0E06256-ABF0057DF16/\\$file/Fertilizaci%C3%B3n+de+Fresa.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/$webindex/69399A4146EAEC0E06256-ABF0057DF16/$file/Fertilizaci%C3%B3n+de+Fresa.pdf)
17. Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 1-10.
18. El agro (2013). Agricultores le apuestan al cultivo de fresas. Revista difital. Recuperado el 1 de diciembre de 2016, de: <http://www.revistaelagro.com/agricultores-le-apuestan-al-cultivo-de-fresas/>

19. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (Eds.). (2004). *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 1-6). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
20. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2012). Directrices sobre la prevención y manejo de la resistencia a los plaguicidas Recuperado el 1 de diciembre de 2016, de: http://www.fao.org-/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/FAO_RMG_SP.pdf.
21. Farrera P., R. (2004). Acerca de los plaguicidas y su uso en la agricultura. Revista Digital CENIAP HOY, Número 6, septiembre-diciembre 2004. Maracay, Aragua, Venezuela. Recuperado el 5 de diciembre de 2016, de: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n6/arti/farrera_r/arti/farrera_r.htm#Ventajas y desventajas en el uso de plaguicidas.
22. Fernández-Ortuño, D., & Schnabel, G. (2012). First report of thiophanate-methyl resistance in *Botrytis cinerea* on strawberry from South Carolina. *Plant Disease*, 96(11), 1700-1700.
23. Fernández-Ortuño, D., Chen, F., & Schnabel, G. (2013). Resistance to cyprodinil and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. *Plant Disease*, 97(1), 81-85.
24. Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Li, X., & Schnabel, G. (2015). Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 105(4), 424-432.
25. Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C., & Debieu, D. (2008). Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(11), 3933-3940.
26. France A. (2012). Frutilla Consideraciones y Manejo (Enfermedades) Recuperado el 17 de noviembre de 2016, de: <http://www.llahuen.com/Archivos/Documentos-/BOLETIN%20FRUTILLAINIA%20AGRICOLA%20LLAHUEN.pdf>

27. Gepp V & Mondino P, (2011). Control químico. Recuperado el 17 de noviembre de 2016, de: <http://www.pv.fagro-.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/C-QUIMICO.pdf>
28. George, D., & Mallery, P. (2016). IBM SPSS Statistics 23 step by step: A simple guide and reference. Routledge.
28. Giménez G., Psullier, J., & Maeso, D. (2003). Identificación y Manejo de las Principales Plagas y Enfermedades en el cultivo de Frutilla. Recuperado el 5 de diciembre de 2016, de: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream-/item/2782/1/111219240807161309.pdf>
29. González P. (2014). Enfermedades de la frutilla. Recuperado el 5 de diciembre de 2016, de: <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/Enfermedades%20de%20Frutilla12.pdf>
30. Goodwin, S., Herron, G., Gough, N., Wellham, T., Rophail, J., & Parker, R. (1995). Relationship between insecticide-acaricide resistance and field control in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) infesting roses. *Journal of economic entomology*, 88(5), 1106-1112. INTA (2017) Guía práctica de campo para el reconocimiento de plagas frecuentes, organismos benéficos y enfermedades habituales del cultivo de frutilla en el Noroeste Argentino Recuperado el 12 de diciembre de 2016, de: <http://inta.gob.ar/sites/default/files/intafrutilla.pdf>
31. Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W. H., Kansako, M., Nishimura, K., Takahashi, K., & Oshima, M. (2009). Characterisation of QoI resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest management science*, 65(8), 916-922,
32. Johnston, P. R., Hoksbergen, K., Park, D., & Beever, R. E. (2014). Genetic diversity of *Botrytis* in New Zealand vineyards and the significance of its seasonal and regional variation. *Plant pathology*, 63(4), 888-898.
33. Keressies, A., Bosker-Van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M., & Van Kan, J. A. L. (1997). Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease*, 81(7), 781-786.

34. Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W., Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013). Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 159-167.
35. Leroux, P. (2004). Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. Pages 195-222. In: Y Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen (eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 428 pp.
36. Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., & Walker, A (2010). Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and environmental microbiology*, 76(19), 6615-6630.
37. Li, X., Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., & Schnabel, G. (2014). Resistance to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology*, 104(7), 724-732.
38. Liu, S., Che, Z., & Chen, G. (2016). Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Protection*, 84, 56-61.
39. Loor, J. (2008). Estudio de la Combinación de Fertilizantes químicos en vivero de Palma Aceitera Híbrida (*Elaeis Oleífera* X *Elaeis Guineensis*) para Optimizar el Desarrollo en Palmeras del Ecuador-Cantón Shushufindi.
40. Margaret T. (2004), "Qué son los fungicidas? Cornell University. Traductores: Luisa Santamaria Oregon State University, N. Willamette Research & Extension Center, Aurora, OR, USA & José Carlos Ureta R. Departamento de Protección Vegetal - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá, Panamá. Recuperado el 17 de febrero de 2017, de: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidesSpanish.aspx>
41. Maroto, J. (1992). *Horticultura herbácea especial*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid – España. pp. 473 - 479.

42. Meier, U. (2001). Estados de las plantas mono y dicotiledoneasado Recuperado el 17 de febrero de 2017, de: [http:// www.yumpu.com/es/document/view-/2494906/codigo-bbch/61](http://www.yumpu.com/es/document/view-/2494906/codigo-bbch/61)
43. Mondino P. (2001) Manejo de la Resistencia a lo Fungicidas. Recuperado el 20 de febrero de 2017, de: <http://www.argenpapa.com.ar/img/Resistencia%20a%20-fungicidas.pdf>
44. Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, Tzavella-Klonari K (2007). Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 91:407–413. doi: 10.1094/PDIS-91-4-0407.
45. Northover, J., & Matteoni, J. A. (1986). Resistance of *botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. *Plant Disease*, 70(5), 398-402.
46. Nufarm (2017). Rovral Fungicida, Recuperado el 15 de enero de 2017, de: <http://www.nufarm.ec/Assets/17877/1/FTIPRODIONEAGROGEN500SC.pdf>
47. Obregón A. Y Santos M. (2014). Prácticas Culturales para la Producción Comercial de Fresas en Florida1 Recuperado el 15 enero 2017, de: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/HS/HS-116000.pdf>
48. Paullier J. (2003). Identificación y Manejo de las Principales Plagas y Enfermedades en el cultivo de Frutilla. Recuperado el 23 de noviembre de 2016, de: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807161309.pdf>.
49. Plimmer J, Gammon D Y Ragsdale, (2003). *Encyclopedia of Agrochemicals*. 528: 168. Recuperado el 15 de enero de 2017, de: www.mrw.interscience.wiley.com/boa
50. Point (2017). Point Benomil 50 pm. Recuperado el 15 de enero de 2017, de: <http://www.point.cl/index-.php/fungicidas/13-productos/fungicidas/35-point-benomyl>

51. Rodriguez M., Gerding M. (2012). Frutilla Consideraciones y Manejo (Monitoreo y Manejo de Trips) Recuperado de: <http://www.llahuen.com/Archivos/Documentos/BOLETIN%20FRUTILLA-INIA%20AGRICOLA%20LLAHUEN.pdf>
Consultado: 2014-05-12
52. Rubinstein, J. *Fragaria xananassa*: Past, Present and Future Production of the Modern Strawberry. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy, Recuperado el 24 de diciembre de 2016, de: <http://hdl.handle.net/11299/175838>.
53. Senasa, (2014) *Botrytis cinerea* Recuperado el 15 de noviembre de 2016, de: <http://www.sinavimo.gov.ar/-plaga/botrytis-cinerea>.
54. Shao, W., Yang, Y., Zhang, Y., LV, C., Ren, W., & Chen, C. (2015). Involvement of BcStr2 in methionine biosynthesis, vegetative differentiation, multiple stress tolerance and virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*.
55. Staudt G, (1989). The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horticulture* 256: 23 33
56. Steel, C. C., & Nair, N. G. (1993). The physiological basis of resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 47(1), 60-68.
57. Syngenta (2017). Swith Fungicida. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de: <http://www.syngenta.cl/-/product/crop-protection/fungicidas/switchr-625-wg-1>
58. Syngenta, (2013). Cultivar Mónaco. Recuperado el 21 de noviembre de 2016, de: <http://www.syngenta.com/country/es/-sp/productos/Documents/ft/ft-broculi-monaco.pdf>.
59. The american phytopathological society. (2017). Que son los Funguicidas. Recuperado el 4 de diciembre de 2016, de: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics-/Pages/fungicidesSpanish.aspx>.

60. Thorpe, J. R., & Hall, J. L. (1984). Chronology and elicitation of changes in peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in wounded wheat leaves in response to inoculation by *Botrytis cinerea*. *Physiological plant pathology*, 25(3), 363-379.
61. Turchi, A. (1999). Guía Práctica de Horticultura. Editorial CEAC Grupo Editorial. Barcelona – España. 182-185 pp
62. Ucpm. (2014). Agricultura y Recursos Naturales. Guía de Manejo Integrado de Plagas de Fresas. Universidad de California. Recuperado el 20 de diciembre 2016, de: <http://ipm-ucdavis.edu/PMG/r734300211.html>.
63. Undurraga, P., Y Vargas, S. (eds.) (2013). Manual de frutilla. Boletín INIA N° 262. 112 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
64. Vázquez A. & López J. (2008). Alternativas Químicas al uso de Bromuro de Metilo en el Cultivo de Fresa. Recuperado el 20 de diciembre de 2016, de: <http://app1.semarnat.gob.mx:8080/sissao-/images/pdf/FRESA-MICHOACAN.pdf>.
65. Volcy, C (2008) “Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. Universidad Nacional de Colombia - Medellin.
66. Wedge, D. E., Curry, K. J., Kreiser, B., Curry, A., Abril, M., & Smith, B. J. (2013). Fungicide resistance profiles for 13 *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in southeastern Louisiana. *International Journal of Fruit Science*, 13(4), 413-429.
67. Yan, H. J., Jurick, W. M., Lou, Y. G., Gaskins, V. L., & Kim, Y. K. (2014). First report of pyrimethanil resistance in *Botrytis cinerea* from stored apples in Pennsylvania. *Plant disease*, 98(7), 999-999.
68. Yarden, Y., & Kata. Y. (1999) Muraa amino of betabulina that correlqtive with benomyl of of fiel penotuto y el fibe sl junto

69. Yarden, O., & Katan, T. (1993). Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 83(12), 1478-1483.
70. Yourman, L. F., & Jeffers, S. N. (1999). Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83(6), 569-575.
71. Yourman, L. F., & Jeffers, S. N. (1999). Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83(6), 569-575.
72. Zhang, C. Q., Yuan, S. K., Sun, H. Y., QI, Z. Q., Zhou, M. G., & Zhu, G. N. (2007). Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology*, 56(4), 646-653.
73. Ziogas, B. N., Markoglou, A. N., & Malandrakis, A. A. (2003). Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4), 311-317.

XI. ANEXOS

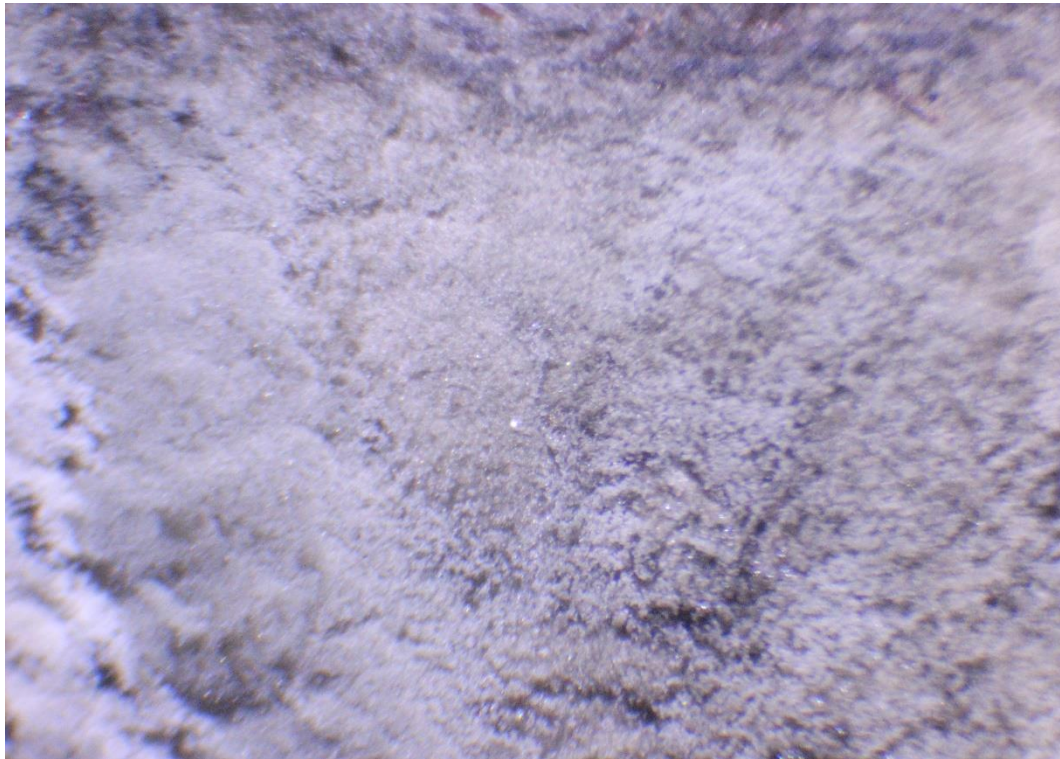
Anexo 1. Frutos utilizados en la prueba de patogenicidad procedentes del cantón Cevallos Tungurahua



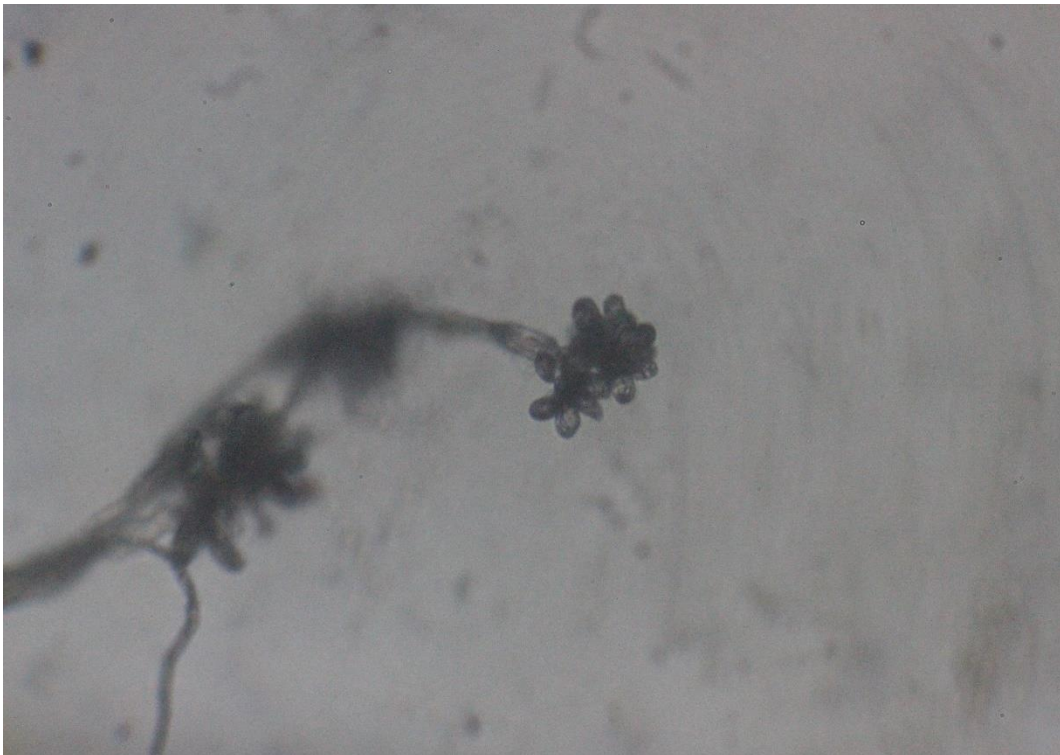
Anexo 2. Inoculación de *Botrytis cinerea* en suspensión en frutos sanos de frutilla



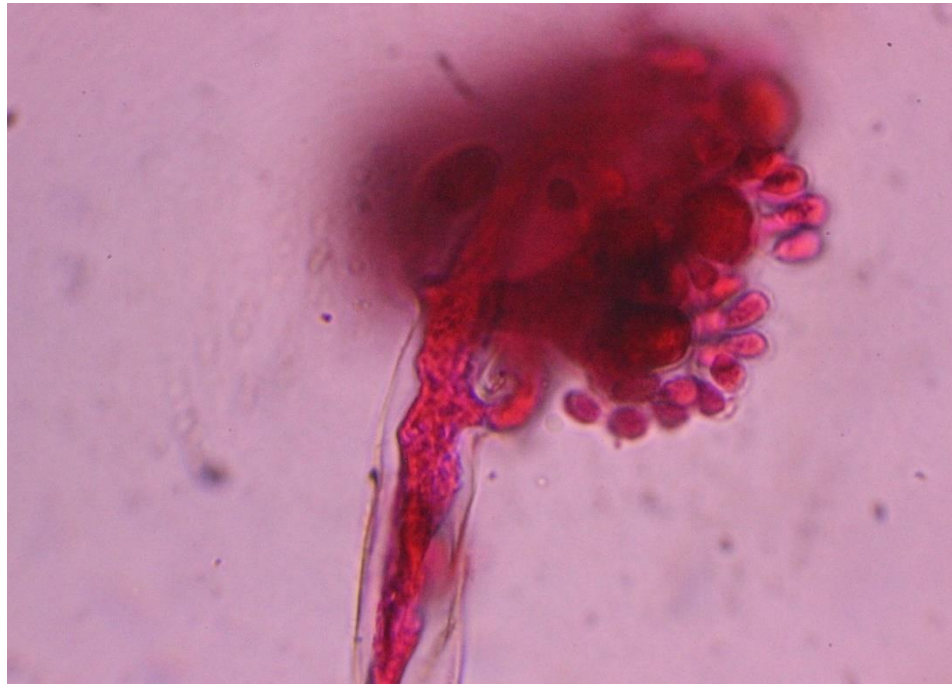
Anexo 3. Micelio gris de *Botrytis cinerea* sobre el fruto sano



Anexo 4. Conidióforo de *Botrytis cinerea*



Anexo 5. Conidióforo de *Botrytis cinerea* 400 x



Anexo 6. Microesclerocios de *Botrytis cinerea*

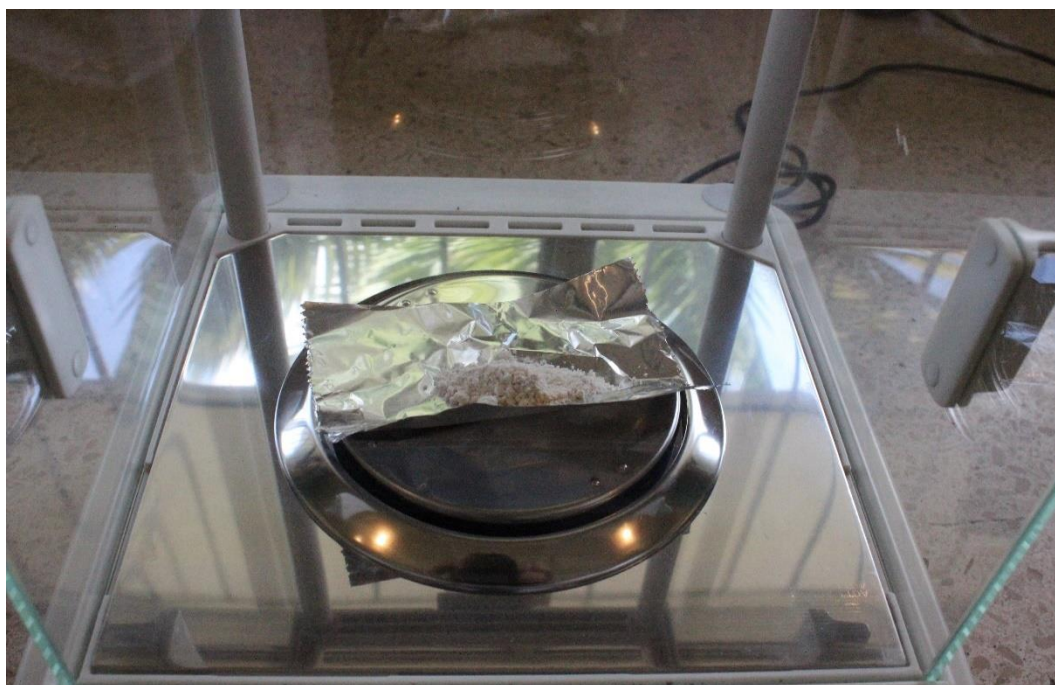


Anexo 7. Microesclerocios de *Botrytis cinerea*

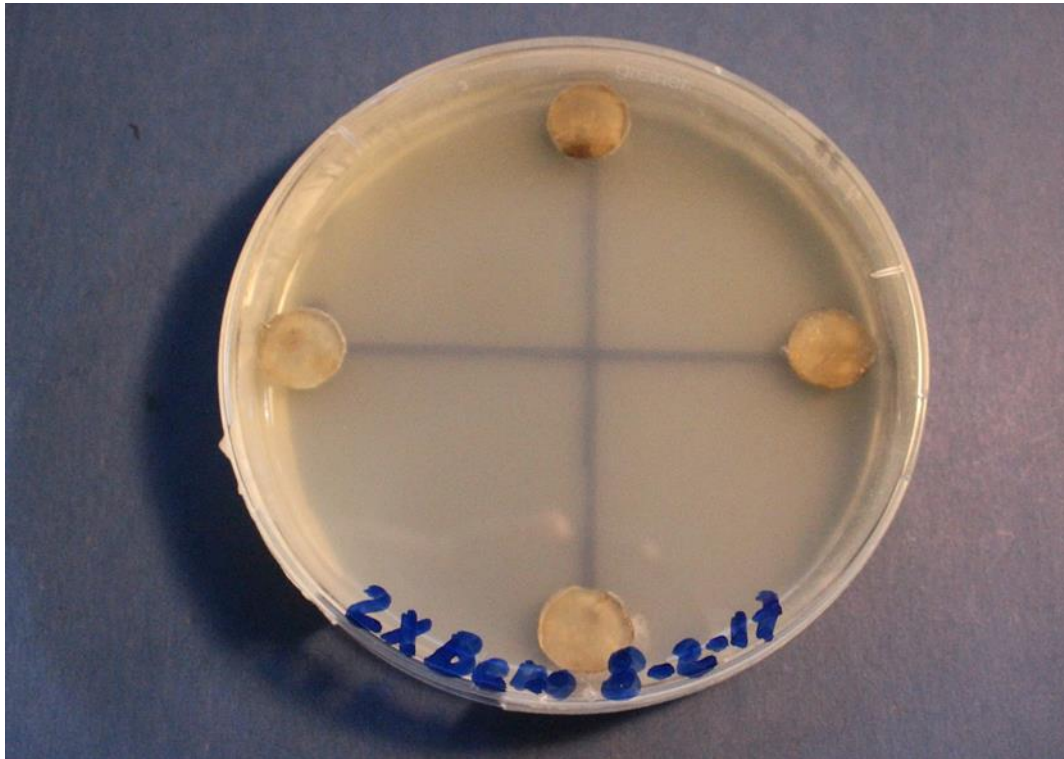


Anexo 8. Medio PDA con distintos volúmenes



Anexo 9. Preparación de soluciones madre con diferentes ingredientes activos**Anexo 10.** Pesaje de fungicida con presentación en polvo mojable

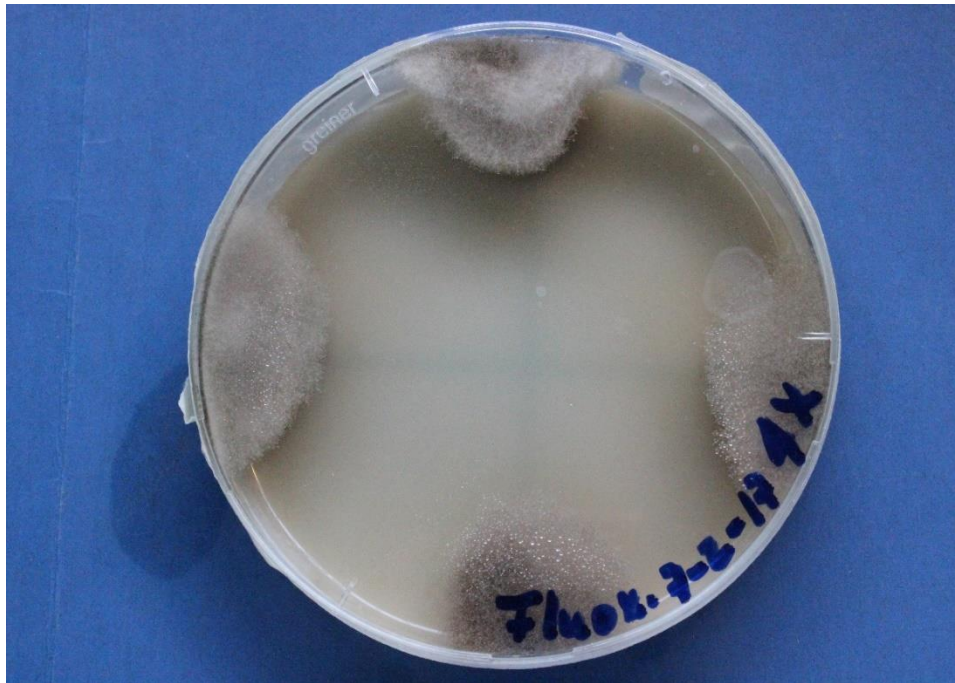
Anexo 11. Preparación de soluciones madre con diferentes ingredientes activos



Anexo 12. Medición del crecimiento radial de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con 8 moléculas botrycidas



Anexo 13. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con fluodixionil mas cyprodinil



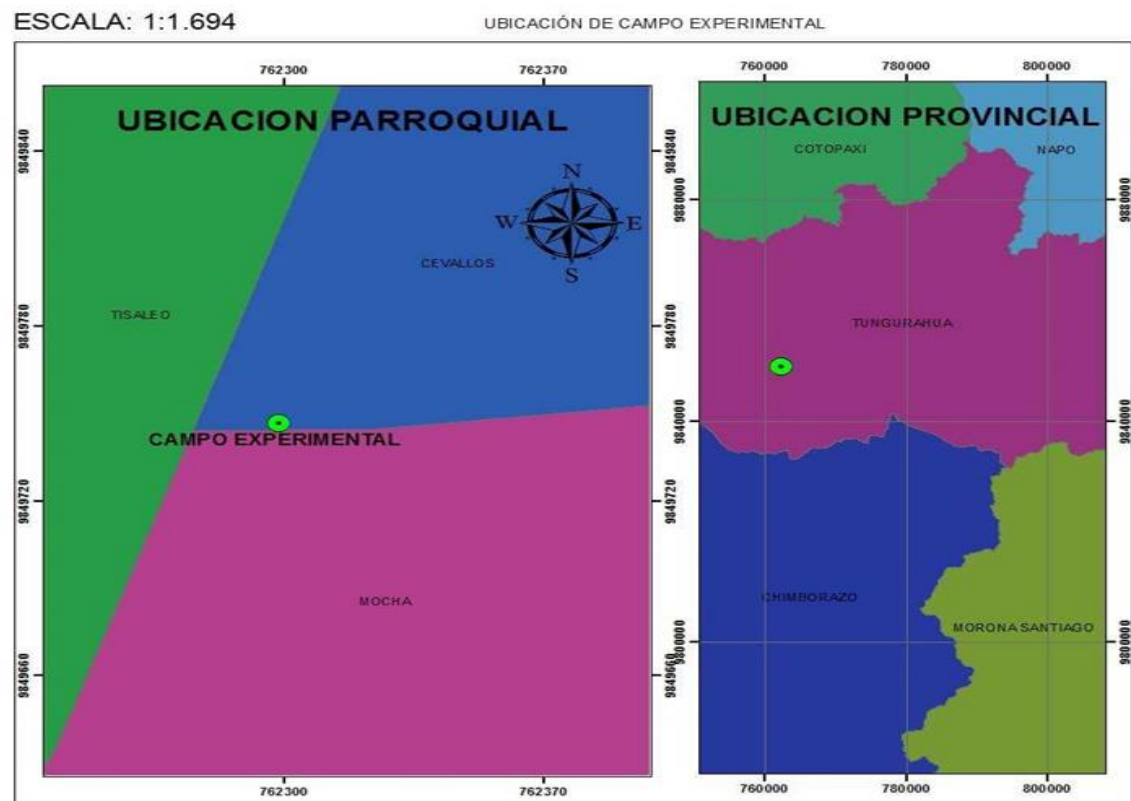
Anexo 14. Espora geminada de *Botrytis cinerea* en agar



Anexo 15. Productos utilizados en la prueba de sensibilidad



Anexo 16. Sitio del muestreo



Anexo 17. Características técnicas de los ingredientes activos en diferentes concentraciones utilizadas en la prueba de sensibilidad

Ingredientes activos (i.a)	Presentación	Concentración g/l ó g/kg	cc/litro Campo	Solución Madre 50 ml (10 x)	4x	2x	1x	0,5	0,25
Boscalid	suspensión concentrada	200	0.5	0.25	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Cresoxin methyl		100							
Carbendazim	Polvo Mojable	500	1.5	0.75	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Iprodione	suspensión concentrada	500	1.25	0.63	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Methil Thiofanato	Polvo Mojable	700	1	0.50	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Procymidone	suspensión concentrada	500	1	0.50	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Pyrimethanil	suspensión concentrada	400	1	0.50	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Iodocitrato de Cobre	suspensión concentrada	196	2	1.00	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml
Fluodioxinil	Granulos dispersables	250	1,6	0.80	16 ml	8 ml	4 ml	2 ml	1 ml